

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年10 月28 日 (28.10.2004)

PCT

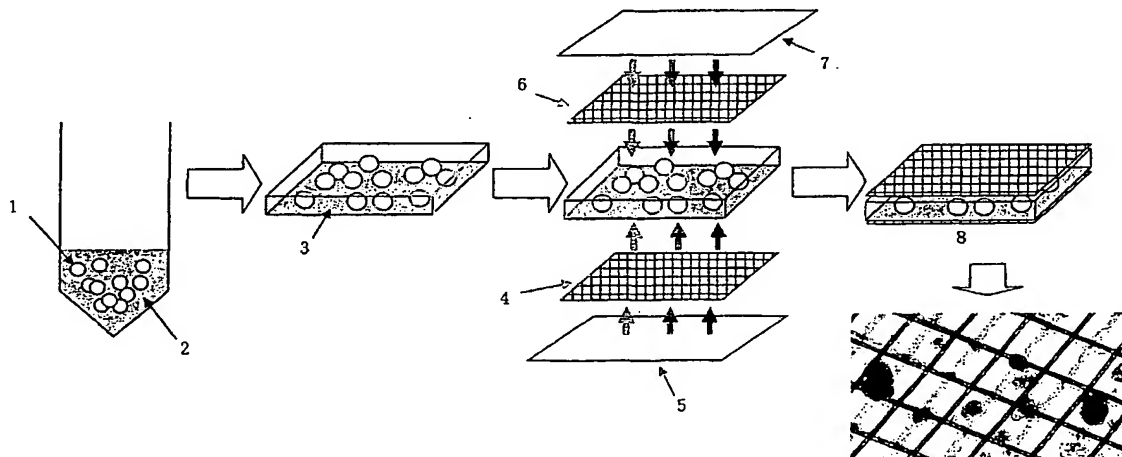
(10) 国際公開番号
WO 2004/091679 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61L 27/38, A61K 35/12 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 顧元駿 (GU, Yuan-jun) [CN/JP]; 〒606-8507 京都府 京都市 左京区聖護院川原町 5 3 京都大学再生医科学研究所内 Kyoto (JP).
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014271 角昭一郎 (SUMI, Shoichiro) [JP/JP]; 〒606-8507 京都府 京都市 左京区聖護院川原町 5 3 京都大学再生医科学研究所内 Kyoto (JP).
(22) 国際出願日: 2003 年11 月10 日 (10.11.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2003-112103 2003 年4 月16 日 (16.04.2003) JP (74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒530-0003 大阪府 大阪市 北区堂島 2 丁目 1 番 2 7 号 桜橋千代田ビル 5 階 Osaka (JP).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社クリエイティブ (CREATIVE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒600-8095 京都府 京都市 下京区東洞院通綾小路下る扇酒屋町 3 0 2 番地 Kyoto (JP). (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BR, BW, BY, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, EG, GE, HR, ID, IL, IN, IS, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, RU, SC, SG, SY, TJ, TN, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA.
(71) 出願人 および (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[続葉有]

(54) Title: CELLULAR PREPARATION

(54) 発明の名称: 細胞製剤



(57) Abstract: A cellular preparation wherein cells capable of secreting a biologically active factor, such as hormone or protein, useful for patients can be stably retained in polyvinyl alcohol for a prolonged period of time; a process for producing the cellular preparation; and a method of preventing/treating internal secretion and metabolism diseases, hemophilia, bone disease, cancer, etc. by administration of the cellular preparation to patients.

(57) 要約: 本発明は、患者にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を分泌する細胞を、ポリビニルアルコール中で安定かつ長期に保持できる細胞製剤並びに該細胞製剤の製造方法、及び該細胞製剤を患者に投与することによる内分泌・代謝疾患、血友病、骨疾患又は癌等の予防・治療方法を提供する。



FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BR, BW, BY, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, EG, GD, GE, HR, ID, IL, IN, IS, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, RU, SC, SG, SY, TJ, TN, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,

SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)の指定のための出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))

- USのための発明者である旨の申立て (規則4.17(iv))

添付公開書類:

- 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

細胞製剤

5 技術分野

本発明は、ヒト又は動物用の医薬品組成物として有用な細胞製剤に関する。
より詳しくは、生体にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性
因子を産生・分泌する細胞或いは有害な物質を解毒する作用を有する細胞を、
安定かつ長期に保持する製剤であって、患者に投与することによって、内分泌・
10 代謝疾患、血友病、骨疾患又は癌等の予防・治療に効果を発揮する細胞製剤に
関する。

背景技術

バイオ人工臓器とは、生細胞や生体組織等を含有し、患者に必要な代謝機能、
15 具体的にはその代謝機能を司るホルモンやタンパク質等の生物学的活性因子を
患者に供給することによって、患者の疾病を予防又は治療することを目的とす
る装置である。免疫抑制剤による副作用やドナーの需要と供給等の問題を有す
る生体臓器移植と比べ、バイオ人工臓器は、免疫隔離膜によって細胞を生体の防
御機構から保護できるため、免疫抑制剤を必要とせず、同種移植のみならず異
20 種移植も可能であるという点で優れている。

バイオ人工臓器は、その中に含有する細胞等の種類を変えることにより、あ
らゆる疾患の治療に対応できる。例えばバイオ人工膵島は、インスリン分泌細
胞、例えば膵島細胞をその中に有し、膵島細胞から分泌されるインスリンホル
モンを患者に供給して血糖値の是正を図るために用いられる。血液凝固因子生
25 産型バイオ人工臓器は、その内部に血液凝固因子を生産する肝細胞を有してお
り、V I I I 因子やX I 因子の不足により血液の凝固障害を有する血友病の治

療に用いられている。また、成長ホルモン生産型バイオ人工臓器は、その内部に成長ホルモン（hGH）分泌細胞を有しており、成長ホルモンの分泌不足が原因で起こる下垂体小人症等の治療に用いられている。また、副甲状腺ホルモンおよびエリスロポエチンをそれぞれ分泌する細胞をバイオ人工臓器に含有させることにより、上皮小体機能低下症及び貧血のような他の疾病も治療することができる。

バイオ人工臓器には様々な形状がある。その例として、細胞を高分子重合体で包み込んだマイクロカプセル型又はマクロカプセル型等が挙げられる。これらは、高分子重合体が有する強固な架橋構造によって、その中に含有される細胞を生体の防御機構から護り、更に高分子重合体が有する分子透過能を利用して、細胞から分泌されるホルモン等を生体に供給することを特徴としている。

マクロカプセル型人工臓器等に用いられる高分子重合体として、近年、ポリビニルアルコール（以降PVAと略す）が着目されている。PVAは、従来より食品業界や医療業界において用いられ、具体的には手術用縫合糸や食品と接触する容器等に応用されてきた。また、PVAを人工関節軟骨材料として用いる技術（例えば非特許文献1参照）がこれまでに開示されており、臨床面での安全性についても評価されている（例えば非特許文献2参照）。

PVAは、化学的又は物理的处理を施すことによりゲル化し、あらゆる形状に成形が可能である。化学的处理としては、PVAを含む水溶液にグルタルアルデヒド（架橋剤）及び塩酸（触媒）を添加する方法（例えば非特許文献3参照）、又はPVAを含む水溶液をガラスプレート等に塗布し、これを Na_2SO_4 /KOH水溶液に浸漬する方法（例えば非特許文献4参照）等が、また物理的处理としては、PVAを含む水溶液を約 -80°C で急冷しゲル化する方法等が通常用いられる。しかしながら、PVAをマクロカプセル型人工臓器等の高分子重合体として用いる場合には、これらの化学的又は物理的处理の必要性が問題となる。

具体的には、PVAを化学的処理によりゲル化して袋状のPVAゲル膜を作製し、その袋内に細胞を入れてバイオ人工臓器を作製するという方法がある。しかしながらこの方法では、袋のシーリング処理やPVAゲル膜に残存した架橋剤等により細胞がダメージを受けたり、袋内の細胞が凝集することにより細胞が壊死する等、生存細胞数の減少又は生物活性の低下によるホルモン分泌量の低下が否めない。

- 物理的処理は薬剤を使用することがなく、またPVAゲル中に細胞を分散させて包含することができるため、凝集等による細胞の壊死の危惧がない点で好ましいが、 -80°C で急冷する際に細胞が破壊される恐れがある。
- 10 バイオ人工臓器内に含有された細胞は、患者に必要な代謝機能を発揮する生物学的活性因子を安定に供給できる状態にあることが望ましい。従ってPVAは、その特性からマクロカプセル型バイオ人工臓器等に適した高分子重合体ではあるものの、その応用技術は未確立であった。よって本発明の如く、PVAが有する特性を利用し、かつPVAゲル内で細胞を安定に保持できるバイオ人工臓器はこれまでに全く知られていない。
- 15

特許文献 1

- 小林ら (Kobayashi M., et al.)、ポリビニルアルコールハイドロゲル製人工関節軟骨の予備研究 (Preliminary study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus)、バイオマテリアルズ (Biomaterials)、2003 年、第 24 巻、p639-647
- 20

非特許文献 1

- 小林ら (Kobayashi M., et al.)、ポリビニルアルコールハイドロゲル製人工関節軟骨の予備研究 (Preliminary study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus)、バイオマテリアルズ (Biomaterials)、2003 年、第 24 巻、p639-647
- 25

非特許文献 2

C Cデメルリスら (C.C.Demerlis et.al)、ポリビニルアルコールの口腔内毒性に関する調査 (Review of the oral toxicity of PVA)、フードアンドケミカルトキシコロジー (Food and Chemical Toxicology)、2003 年、第 41 巻、p319-326

5 非特許文献 3

クリスティーナ B ら (Krystyna Burczak et. al)、マイクロカプセル型 P V A ハイドロゲル人工膵の生体内長期安定性と生物学的互換性 (Long-term in vivo performance and biocompatibility of PVA hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas)、バイオマテリアルズ (Biomaterials)、1996
10 年、第 17 巻、p2351-2356

非特許文献 4

タイ・ホーン ヤンら (Tai-Horn Young et. al) 生体内 P V A 人工膵の評価とモデリング (Assessment and modeling of PVA bioartificial pancreas in vivo)、バイオマテリアルズ (Biomaterials)、2002 年、第 23 巻、p3495-3501
15

発明の開示

本発明は、ヒト又は動物用の医薬品組成物として有用な細胞製剤を提供することを目的とする。より詳しくは、患者にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を分泌する細胞を、パイオ人工臓器に用いられる高分子重合体として適切な材料である P V A 中で安定かつ長期に保持できる細胞製剤及び該細胞製剤の製造方法を提供することを目的とする。更には、該細胞製剤を患者に投与するにより、内分泌・代謝疾患、血友病、骨疾患又は癌等の予防・治療方法を提供することを目的とする。
20

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、予め P V A を細胞保存剤、例えば Euro-Collins 液、セルバンカー又は UW 液等で処理した
25 後に細胞と混合してゲル化させることによって、P V A ゲル中の細胞の死滅率

やダメージを低減することができ、PVA中で細胞が安定に保持されることを見出した。より具体的には、粉体のPVAを液状細胞保存剤で溶解してPVA-細胞保存剤混合液を作製後、その混合液中に細胞を分散させて急冷し、PVAをゲル化させることにより、PVA中の細胞の生存率及び生物学的活性因子分泌機能の低下が抑制されること、更には、安定に長期間患者にホルモン又はタンパク質等を供給することができる細胞製剤が得られることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて更に検討を重ね、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は

- 10 (1) 細胞保存剤が配合されたポリビニルアルコール中に、細胞を含有する細胞製剤、
- (2) 細胞表面が、更に細胞外マトリックスで覆われていることを特徴とする前記(1)に記載の細胞製剤、
- (3) 更にグロースファクターを含有することを特徴とする前記(1)又は
- 15 は(2)に記載の細胞製剤、
- (4) 細胞が、膵島細胞、膵内分泌細胞、肝細胞、前葉細胞、成長ホルモン分泌細胞、骨細胞、甲状腺ホルモン分泌細胞及び副甲状腺ホルモン分泌細胞から成る群から選択される1種又は2種以上の細胞であることを特徴とする前記(1)～(3)のいずれかに記載の細胞製剤、
- 20 (5) 細胞が、細胞保存剤で処理されていることを特徴とする前記(1)～(4)のいずれかに記載の細胞製剤、
- (6) 細胞が、形質転換体であることを特徴とする前記(1)～(5)のいずれかに記載の細胞製剤、
- (7) シート状、板状、棒状、チューブ状又はビーズ状の形状を有することを特徴とする前記(1)～(6)のいずれかに記載の細胞製剤、
- 25 (8) 細胞保存液が、Euro-Collins液、セルバンカー又はUW液であるこ

とを特徴とする前記（１）～（７）のいずれかに記載の細胞製剤、

（９） 哺乳動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に移植することを特徴とする前記（１）～（８）に記載の細胞製剤、

（１０） 前記（１）～（９）のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを
5 特徴とする内分泌・代謝疾患の予防及び治療方法、

（１１） 内分泌・代謝疾患が、糖尿病又は下垂体性小人症であることを特徴とする前記（１０）に記載の内分泌・代謝疾患の予防及び治療方法、

（１２） 前記（１）～（９）のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする血友病の予防及び治療方法、

10 （１３） 前記（１）～（９）のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする骨疾患の予防及び治療方法、

（１４） 前記（１）～（９）のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする癌の予防及び治療方法、

（１５） 前記（１）～（９）のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを
15 特徴とする肝不全又は先天性代謝異常の予防及び治療方法、

（１６） ポリビニルアルコールに細胞保存剤を配合後、細胞を該ポリビニルアルコールに混合し、得られた細胞含有ポリビニルアルコールをゲル化することを特徴とする細胞製剤の製造方法、

（１７） ヒト又は動物用の医薬である前記（１）～（９）のいずれかに記載の細胞製剤、
20 に関する。

図面の簡単な説明

第１図は、シート状膵島細胞製剤の製造方法を示す模式図である。

25 第２図は、製造例１、比較例１又は遊離膵島細胞の培養１日後の生細胞の回収率を調べた結果を示す図である。

第3図は、製造例1、比較例1又は遊離膵島細胞中の培養1日後のインスリン含有量を調べた結果を示す図である。

第4図は、製造例1、比較例1又は遊離膵島細胞のインスリン分泌能を経時的に調べた結果を示す図である。

- 5 第5図は、製造例1又は比較例1に含有される膵島細胞を経時的に観察した顕微鏡写真を示す図である。

第6図は、製造例2又は遊離膵島細胞のインスリン分泌能を調べた結果を示す図である。

第7図は、移植マウス群および糖尿病マウス群の生存期間を示す図である。

- 10 第8図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群の血糖の変化を示す図である。

第9図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群の体重の変化を示す図である。

- 15 第10図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群のBUN（血中尿素窒素）の変化を示す図である。

第11図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群のクレアチニンの変化を示す図である。

第12図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群の24時間尿量の変化を示す図である。

- 20 第13図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群の24時間尿糖排泄量の変化を示す図である。

第14図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群の尿ケトン体量の変化を示す図である。

- 25 第15図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群の24時間尿アルブミン排泄量の変化を示す図である。

第16図は、移植マウス群、糖尿病マウス群および正常血糖マウス群の1,

5 - A G 量の変化を示す図である。

図中の符号 1 は臍島細胞を、2 は P V A + E C 溶液を、3 は P V A + E C ゲルを、4 及び 6 はメッシュシートを、5 及び 7 はガラスプレートを、8 はシート状臍島細胞含有製剤を表す。

5

発明を実施するための最良の形態

本発明は、細胞保存剤を配合した P V A を含有し、その P V A 中に患者にとって有用なホルモンやタンパク質等の生物学的活性因子を産生・分泌する細胞を有していることを特徴とする。

- 10 本発明で用いられる P V A は、本発明の目的を阻害しない限りどのようなものでもよいが、例えば目薬の角質保護・保湿剤、腸管癒着防止膜等の医用材料や、食品包装フィルム等の食品接触材料として用いられうる程度の純度を有するものであることが好ましい。また市販物であっても、酢酸ビニルからポリ酢酸ビニルを作り、これを加水分解することにより得られる製造物の凍結乾燥品
- 15 であってもよい。また P V A を製造する場合、その製造方法並びに凍結乾燥方法は、それ自体公知の技術に従ってよい。P V A の平均重合分子量は、約 5, 0 0 0 ~ 1 6, 6 0 0 程度で、ケン化度は約 8 5 % 以上のものが好ましい。

これらの P V A は、細かい粒子状の凍結乾燥品で、生理食塩水やリン酸バッファー等の溶液に容易に懸濁できる形状であることが望ましい。

- 20 細胞保存剤が配合された P V A とは、P V A 中に細胞保存剤を含有する P V A を意味する。本発明で用いられる細胞保存剤は、特に限定されないが、通常動物細胞等の保存に用いられる液剤であって、例えば Euro-Collins 液又はセルバンカー (SERUBANNKA code 630-01601 : Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan) や UW 液 (ピアスパン ViaSpan : Bristol-Myers Squibb
- 25 Company, USA) 等の市販の保存液であってよい。これらは市販のものであっても、実験室内で調製された組成物であってもよい。実験室で調製する場合は、

蒸留水等に各組成成分を添加・混合し、フィルターろ過等することにより除菌して調製することが好ましい。例えば、Euro-Collins 液の組成は、第1表の通りである。

第1表

成分	g/L
D-グルコース	35.0
K_2HPO_4	7.4
KH_2PO_4	2.05
KCl	1.12
$NaHCO_3$	0.84
ニコチンアミド	1.22

5

また、UW液（ピアスパン）の組成は、第2表の通りである。

第2表

溶液に対して、通常約 2～5 重量%、より好ましくは約 2.5～3.5 重量%、特に好ましくは約 2.5～3 重量%である。これは、該濃度域において PVA が最もゲル化し易く、かつ本発明の細胞製剤の細胞を包含するのに好ましい強度の PVA ゲルが得られるからである。また PVA-細胞保存剤溶液中の細胞

5 保存剤の濃度は、通常の細胞保存に用いる細胞保存剤の濃度を 1 倍とすると、通常約 0.8～1 倍、より好ましくは約 0.9～1 倍、特に好ましくは約 0.95～1 倍である。これは、該濃度域の範囲を外れると、細胞が安定に生存できない場合があるからである。従って、本発明においては、通常の細胞保存に用いる濃度の約 2～10 倍である濃縮細胞保存液を調整又は購入し、これと上記 PVA 懸濁水溶液とを適宜（例えば、10 倍濃縮細胞保存液：PVA 懸濁水溶液＝1：9）混合して、約 1 倍濃度の細胞保存剤を含有する PVA-細胞保存剤溶液を作製するのが好ましい。

10

本発明の細胞製剤には、更に、細胞の保護を目的としてジメチルスルフォキシド（DMSO）や血清アルブミン等が、雑菌の混入を阻止する目的で抗生物質等が、また細胞の活性維持のためにニコチンアミド等のビタミン類等が含まれていてもよい。更に本発明は、通常製剤に添加されることが薬事法上許容されている他の添加成分、例えば徐放性付与剤、等張化剤、pH 調整剤等が補填されていてもよい。これら他の添加成分の、細胞製剤への添加方法は特に限定されないが、上記 PVA-細胞保存剤溶液を作製する際に、該溶液中に無菌的に混合されるのが好ましい。これらの含有量は、本発明に含まれる細胞の増殖・生存及び／又は生物学的活性因子の分泌等を阻害しない範囲であって、本発明の目的を損なわない範囲であることが好ましい。

15

20

細胞保存剤で処理された PVA は、上述した様に無菌的に製造されることから、本発明の細胞製剤は雑菌等による汚染の確率が低く、室温（約 15～35℃）で長期間保存が可能である。

25

本発明に用いられる細胞として、膵島細胞、膵内分泌細胞、肝細胞、前葉細

胞、成長ホルモン分泌細胞、骨細胞、甲状腺ホルモン分泌細胞又は副甲状腺ホルモン分泌細胞等を挙げることができる。これらの細胞は、ヒト、ブタ、ラット又はマウス等の哺乳動物由来であって、患者にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を産生・分泌する細胞であることが好ましい。

- 5 細胞の種類を選択は、投与される患者の疾患の種類によって決定されるのが好ましい。例えば、糖尿病患者等にはインスリンを産生する膵島細胞又は膵内分泌細胞等を、血友病患者等には血管凝固因子等を産生する肝細胞等を、下垂体性小人症等の患者には成長ホルモンを産生する前葉細胞や成長ホルモン分泌細胞等を、また骨折等の骨疾患患者には骨形成タンパク質（Bone Morphogenetic Protein : BMP）を産生する骨細胞等を用いるのがよい。癌患者等には、遺伝子組換えにより腫瘍成長抑制物質を大量に産生しうる形質転換細胞等を用いることもできる。また肝不全、腎不全又は先天性代謝異常等により体内に有毒な代謝産物が蓄積する疾患の患者に対しては、有毒な代謝産物を選択的に代謝・解毒する作用を有する細胞を用いることもできる。患者が複数の疾患を有する等、複数の生物学的活性因子を必要とする場合には、上記細胞を2種以上組み合わせてもよい。本発明はこれらの細胞を含有することにより、上記患者等に有用な生物学的活性因子を供給することができる。従って、本発明の細胞製剤を用いることにより、生物学的活性因子を供給することや有害な代謝産物を解毒することにより治療が可能な様々な疾患の発症を予防したり、治療することができる。
- 10
15
20

本発明に用いられる上記の細胞は、実験室用に確立された細胞又は生体の組織から分離した細胞等のいずれであってもよいが、分化した非分裂細胞であることが好ましい。何故なら未分化な分裂細胞よりも、分化した非分裂細胞の方が、より目的とするホルモンやタンパク質等を産生・分泌しうるからである。

- 25 生体組織からの細胞の分離方法は特に限定されず、公知の技術に従ってよい。例えば、適切な手段で摘出した組織を、Dispase又はEDTA等で処理

し、ついでトリプシン処理して単一の細胞まで分離する方法等が挙げられる。

例えば本発明に用いられる細胞が膵島細胞である場合、この細胞の生体組織からの分離は、公知のコラゲナーゼ処理による分離方法、例えば J. Adam Van Der Vliet et al., Transplantation, 45(2), p493-495 (1988) 等に従ってよい。

- 5 本発明に用いられる細胞が膵内分泌細胞である場合、例えば特開 2 0 0 1 - 2 3 1 5 4 8 号公報に記載の方法等に従ってよい。

上記のように生体組織から分離された細胞は、病原性ウイルス等の病原体が除去されていることが望ましい。

- 10 実験室用に既に確立された細胞又は生体組織から得られた単一細胞は、適切な培地でコンフルエントになるまで培養され、継代培養を 2 ～ 3 回繰り返してから、本発明の細胞として用いられるのが好ましい。例えば本発明に用いる細胞が、膵島細胞又は膵内分泌細胞（以降膵内分泌細胞等と略す）である場合は、これらの細胞を、例えば 1 0 % ウシ胎仔血清（以降、F B S と略す）及びニコチンアミドを補填した CMRL - 1 0 6 6 培地（Sigma, St. Louis, MO, USA）
15 で継代培養するのが好ましい。継代培養された細胞は、トリプシン処理及びコラゲナーゼ処理等の公知の手段に従って、再度単一細胞として分離され、本発明の細胞として用いることができる。

- 20 また本発明に用いられる細胞は、投与される患者に必要なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子ペプチドをコードする遺伝子が導入された形質転換細胞であってもよい。該形質転換細胞を用いることにより、目的とする生物学的活性因子ペプチドを効率的かつ大量に産生することができる。生物学的活性因子ペプチドをコードする遺伝子としては、既にその塩基配列が公開されており、アメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection : A T C C）等の寄託機関や一般の市販源から容易に入手が可能な遺
25 伝子、又は既知の塩基配列からオリゴヌクレオチドプローブを作製し、該プローブを用いて、例えば P C R 増幅法、DNA 合成法の公知の手段を用いて合成

される遺伝子等が挙げられる。例えば、腫瘍成長抑制タンパク質をコードする遺伝子を有する形質転換細胞を用いることにより、本発明の細胞製剤を癌の予防及び治療剤として使用することができる。

上記の生物学的活性因子ペプチドをコードする遺伝子が導入される宿主細胞は特に限定されず、通常遺伝子組換え技術分野において用いられる公知の宿主細胞を使用してよい。例えば宿主細胞としては、上記の脾島細胞、脾内分泌細胞、肝細胞、前葉細胞、成長ホルモン分泌細胞、骨細胞等の他に、サル細胞C OS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO細胞と略記）、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記）、マウス細胞BALB/3T3、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスC127細胞、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒト細胞HeLa、ヒトFL細胞等が挙げられる。

本発明で用いられる細胞への上記の遺伝子の導入方法は、特に限定されず公知の手段に従ってよい。例えば、プラスミドやウイルス等の組換え発現ベクター又はリボソーム、マイクロカプセル等の人工ベクターに含有させて細胞に導入する等の公知の方法が挙げられる。組換え発現ベクターを用いる場合には、コンピテント細胞法[J. Mol. Biol., 53, p154 (1970)]、DEAEデキストラン法[Science, 215, p166 (1982)]、インビトロパッケージング法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, p581 (1975)]、ウイルスベクター法[Cell, 37, p1053 (1984)]、マイクロインジェクション法[Exp. Cell. Res., 153, p347 (1984)]、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, p133 (1990)]、リン酸カルシウム法[Science, 221, p551(1983)]、リボフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, p7413 (1987)]、プロトプラスト法[特開昭63-248394号公報、Gene, 17, p107, (1982)、Molecular & General Genetics, 168, p 111 (1979)]に記載の方法等を挙げることができる。

また、その遺伝子を宿主細胞に導入するためのベクター等も特に限定されず

導入された細胞内で所望の遺伝子を発現させ、生物学的活性因子ペプチドを有効に産生する事ができる発現ベクターであればよい。例えば、λファージ等のバクテリオファージ、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス (HIV)、センダイウイルス、エプスタインバーウイルス (EBV)、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス、SV40等の動物ウイルス等の他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo等が挙げられる。

本発明に用いられる細胞は、以下の手法によりPVA中に包含されるのが好ましい。

上記で作製したPVA-細胞保存剤溶液中に、細胞を添加・混合する。添加・混合される細胞は、予め細胞保存剤で処理されていることが好ましい。具体的には、細胞を細胞保存剤中に予め懸濁し、遠心により細胞を回収した後、PVA-細胞保存剤溶液と混合するのが好ましい。本発明の細胞製剤中に含有される細胞の数は、該細胞製剤を投与される患者の疾患の種類及び疾患の程度等によって異なるため一概には言えず、医師の判断によって決定されるのが好ましいが、例えばPVA-細胞保存剤溶液中、好ましくは約 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ cells/mlである。細胞数をこの範囲に設定することにより、細胞がPVAゲル内で均等に分散され、細胞凝集等による細胞への酸素及び栄養分の供給が阻害されることなく、細胞が長期間安定に生存することができる。

また本発明に用いられる細胞が、その生物学的活性因子を最適に供給できる状態で安定に保持されるために、本発明の細胞製剤は、更にヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン酸等のムコ多糖、エラスチン、コラーゲン及びフィブリン等から選ばれる1種以上を含む細胞外マトリックス、及び/又は肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、血小板由来成長

因子（PDGF）、インスリン様成長因子（IGF）又は成長ホルモン（GH）等のグロースファクター等を含有していてもよい。これらのグロースファクターは、1種又は2種以上含有されていてもよい。細胞外マトリックス及び／又はグロースファクター等を本発明に含有させる方法としては、例えば、上記P
5 V A－細胞保存剤溶液と細胞とを混合する前に、細胞外マトリックス及びグロースファクターを含有する細胞培養培地等に細胞を浸漬し、細胞表面に細胞外マトリックス等の膜を形成させるか、或いはP V A－細胞保存剤溶液に予め細胞外マトリックス及び／又はグロースファクターを含有させる方法等が挙げられる。本発明の細胞製剤における上記細胞外マトリックス及び／又はグロース
10 ファクター等の含有量は特に限定されないが、本発明に用いられる細胞の保持、生物学的活性因子の分泌機能を阻害しない範囲であって、細胞の生存期間及び生物学的活性因子の分泌期間を延長する効果を付加しうる範囲であることが望ましい。

P V A－細胞保存剤溶液と細胞とを混合後、得られた細胞混合液（以降、細胞含有P V A－細胞保存剤溶液と称す）を冷却し、P V Aをゲル化することにより本発明の細胞製剤を作製することができる。冷却は、例えば約－20～
15 80℃の超低温庫等で約半日～3日間静置したり、約－80℃の超低温庫に約18～30時間保存することにより行うのがよい。

本発明は、P V Aに予め細胞保存剤が配合されているため、上記温度で急冷
20 しても、細胞の死滅やダメージを抑制することができる。しかもP V Aゲル中に細胞を分散して含有することができ、細胞の凝集等を防止することができる。

P V Aがゲル化することにより、本発明は様々な形状、例えばシート状、板状、盤状、棒状、チューブ状又はビーズ状等に形成され得る。例えば、上記細胞含有P V A－細胞保存剤溶液をガラスプレート上に塗抹し、このガラスプレ
25 ートごと冷却することにより、薄膜シート状の細胞製剤を作製することができる。ガラスプレート単位面積当りの細胞含有P V A－細胞保存剤溶液塗抹量を

適宜変化させることにより、所望の厚みを有する細胞製剤を作製することができるが、通常は、約 $100 \sim 300 \mu\text{l}/\text{mm}^2$ である。

本発明の細胞製剤は、その補強又は／及び操作性の簡便化のために、補強材と組み合わせて用いてもよい。例えば、細胞製剤を薄膜シート状にする場合には、その補強及び操作性の簡便化のために、上記細胞含有PVA-細胞保存剤溶液を樹脂製メッシュシート等に固定してゲル化するのがよい。具体的には、第1図において、例えばPET(ポリエチレンテフタレート)樹脂製メッシュシート(4)をガラスプレート(5)上に設置し、このメッシュシート(4)上に細胞含有PVA-細胞保存剤溶液を塗布する。別のメッシュシート(6)を上から被せ、更にその上から別のガラスプレート(7)を被せ、細胞含有PVA-細胞保存剤溶液とメッシュシート(4)及び(6)を、ガラスプレート(5)及び(7)とで挟む。そのまま約 $-20 \sim -80^\circ\text{C}$ で冷却することによりシート状ゲルに成形することができる。また上記メッシュシートは、予めPVA-細胞保存剤溶液に浸漬しておくことが好ましい。

上記の補強材、例えばメッシュシートは、生体にとって安全な素材、つまり生体内において非分解性であって生体適合性に優れた素材、例えばPET等であることが好ましい。これは、生体内において本発明の細胞製剤中のメッシュシートが分解すると、該細胞製剤が生体組織に癒着し、本発明の効果を長期に奏することが困難となるばかりでなく、生体にとっても有害となりうる場合があるからである。もちろん、生体内で分解しても生体に有害でない補強材も、本発明に使用されうることは言うまでもない。

冷凍状態の細胞製剤は、冷凍状態にある細胞を活性化した後に生体に投与されるのが好ましい。冷凍細胞製剤中の細胞の活性化は、細胞を解凍し、適切な培地で再培養することにより行うことができる。具体的には、約 37°C の細胞培養培地、例えばCMRL-1966等に冷凍状態の細胞製剤をすばやく浸漬して解凍した後、更に新たな細胞培養培地で、例えば約24時間培養すること

によって行う。該細胞製剤にDMSOが含まれる場合には、解凍された細胞製剤を新たな細胞保存液、例えばUW液等を用いて洗浄した後、更にUW液中で、例えば約4℃、約24時間浸漬することによって、ゲル中のDMSOを除去するのが好ましい。言うまでもないが、上記のように解凍され、DMSOが除去された細胞製剤も本発明の細胞製剤である。

上記の方法により得られる細胞製剤の生体への投与形態は、投与される患者の疾患の種類、疾患部位、疾患の程度によって異なるため一概に言えず、医師の判断によって決定されるが、好ましい投与形態を以下に述べる。

本発明の細胞製剤を投与する対象は、ヒトをはじめ、イヌ、ネコ、サル、ウサギ及びマウス等のヒト以外の哺乳動物である。

本発明は、上述した通り、生体内の投与部位に適した形状に成形されて投与することができる。また本発明は、疾患を有する組織に直接接触する状態で投与部位に移植されてもよいが、比較的軽微な侵襲で投与できる皮下又は筋肉内に移植することもできる。例えば、チューブ状の該細胞製剤を細断し、移植針等を用いて皮下に移植したり、注射器等に該細胞製剤を充填し、筋肉内や皮下に注入することもできる。しかも該部位からの細胞製剤の回収も容易である。皮下や筋肉内等に該細胞製剤を移植する際、移植部位の血管分布密度が疎であり、細胞が増殖・生存するための酸素及び栄養分の供給が困難と考えられる場合には、公知の適切な血管新生誘導剤等を複合させて移植することもできる。血管新生誘導剤は、細胞製剤中に予め含有させておいてもよいし、細胞製剤とは別の形態で投与されてもよい。

本発明の細胞製剤から患者に供給されるホルモンやタンパク質等の生物学的活性因子の量は、用いられる細胞の生物学的活性因子の分泌能及び移植期間中の細胞生存率の推移等を考慮して、医師の判断により適宜設定することができる。例えば、患者の疾患が糖尿病である場合、用いられる細胞、例えば膵内分泌細胞等のインスリン分泌能を *in vitro* にて予め測定しておき、そのインスリン

分泌能、細胞数、投与期間及び細胞の生存率の推移等から、本発明の細胞製剤のインスリン供給量を決定することができる。本発明の細胞製剤は、含有する細胞を安定に長期間保持できることから、時間経過に伴う生物学的活性因子の分泌能の低下率が低い。従って本発明を用いれば、患者に必要とされる生物学的活性因子を長期間安定して患者に供給することができ、細胞製剤の移植の頻度も少なくすることができる。

本発明の細胞製剤に用いられる細胞の生物学的活性因子の分泌能は、それぞれの生物学的活性因子の測定に適した公知の定量方法に従ってよい。例えば、細胞が膵内分泌細胞等である場合のインスリンの定量方法については、以下の実施例で詳細に説明する。

実施例

以下に、実施例等を示して本発明を具体的に説明するが、言うまでもなく、本発明はこれらに限定されるものではない。尚、「%」は、いずれも「質量%」を表す。

実施例 1

〔製造例 1〕 膵島細胞を含有するシート状細胞製剤の製造

(1) 膵島細胞の調製

8～10週令、体重300～350gのWisterラット（Shimazu animal Co. Ltd. Kyoto, Japan）から、以下の方法により膵島細胞を分離した。

まず摘出したラット膵臓の膵管内に、I型コラゲナーゼ（Sigma, St. Louis, MO, USA, 350U/mg）及び XI 型コラゲナーゼ（Sigma, St. Louis, MO, USA, 2,200U/mg）をそれぞれ800U/ml及び1500U/mlの濃度で含有するハンクス液10mlを注入し、37℃、15～20分間の酵素処理を施した。冷却ハンクス液を添加し、酵素反応を停止した。ピペットを用いて膵臓組織を分散し、遠心により組織ペレットを回収した後、ハンクス液で組織ペレットを

2回洗浄した。尚、遠心は1, 000 rpm、1分間とした。組織懸濁液を800 μ mサイズのメッシュシートを用いてろ過した。ろ過液を50 ml コニカルチューブに回収し、遠心(1500 rpm、3分間)して組織ペレットを得た。該ペレットを27%デキストラン(Sigma, St. Louis, MO, USA, MW 70,000)を含むハンクス液に懸濁し、不連続密度勾配遠心処理した。この時、最下層を27%デキストラン(密度1.094g/ml)、上層を23%デキストラン(密度1.081g/ml)及び11%(密度1.041g/ml)デキストランの2層とした。不連続密度勾配遠心は、400 rpmで4分間、更に1, 700 rpmで10分間行った。遠心後、最上2層の界面より脾島細胞含有画分をパスツールピペットを用いて採取した。得られた脾島細胞をCMRL-1066培地を用いて2回洗浄した(1, 000 rpm、3分間)。

(2) PVA-Euro-collins 溶液の作製

PVA 3 g (グンサー社製:PVA-180H, Lot37435)を75 mlの蒸留水に懸濁後、オートクレーブ(121℃、15分)による加熱溶解滅菌処理を2回施した。得られた無菌PVA水溶液に、10倍濃度Euro-collins 溶液(以降、EC溶液と略す)10 ml、DMSO 5 ml、FBS 10 ml及び0.122 g ニコチンアミドを無菌的に混合・攪拌し、無菌3%PVA-EC溶液100 mlを得た。上記10倍濃度EC溶液は、蒸留水100 mlに、第1表に示す成分を添加・混合した後、0.22 μ mのろ過除菌を行い作製した。作製後は室温で保存した。

(3) 細胞の混合

(1)で得られた脾島細胞を、更に10%FBS及び1.22 g/Lニコチンアミドを含むCMRL-1066培地を用いて、炭酸ガスインキュベーター(5%CO₂、37℃)で24時間培養した。1,000個の脾島細胞を含む培養液を1.5 ml 容遠心チューブ内に入れ、800 rpmで1分間遠心した。得られた細胞ペレットにセルバンカー(SERUBANNKA code 630-01601:Wako

Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan) 0.1 ml を添加し、細胞を懸濁した後5分間放置した。再度遠心して細胞を回収した。回収した細胞を、
(2) で作製した無菌3% PVA-EC 溶液 100 μ l 中に懸濁し、腓島細胞含有 PVA-EC 溶液を得た。

5 (4) シートの形成

10 10 mm \times 10 mm 角の PET 製メッシュシート (グンサー社製: TNO 60 SS) 2 枚を予め無菌3% PVA 水溶液に5分間浸漬し、この内の一枚 (4) をガラスプレート (5) 上に設置した。上記 (3) で得られた腓島細胞含有 PVA-EC 溶液を上記メッシュシート (4) 上に均一に塗布し、もう一枚のメッシュシート (6) を上から被せ、メッシュシート (4) - 腓島細胞含有 PVA-EC 溶液 - メッシュシート (6) の3層構成シートとした。更に上から別のガラスプレート (7) を被せ、圧力を加えて約1 mm 厚の3層構成シートとなるよう調整し、これを2枚のガラスプレートで挟んだ状態のままで-80℃、24時間保存してPVAをゲル化した (第1図)。

15 (5) シート状腓島細胞製剤の解凍及び細胞の活性化

上記 (4) で得られた凍結シート状腓島細胞製剤を、37℃の CMRL-1066 培地中で速やかに解凍した。解凍されたシート状腓島細胞製剤を、5 ml の UW 液 (ピアスパン ViaSpan: Bristol-Myers Squibb Company, USA) 中に5分間浸漬した。この操作を3回繰り返し、該シート内に含有される DMSO を除去した。該シートを更に5 ml の UW 液中で、4℃、24時間浸漬した。浸漬後の該製剤を CMRL-1066 培地で2回洗浄後、更に CMRL-1066 培地中で24時間 (37℃、5% CO₂) 培養し、細胞が活性化されたシート状腓島細胞製剤 (製造例1) を得た。得られた製造例1を、以降の試験例に用いた。尚、上記 (2) で10倍濃度 EC 溶液 10 ml、DMSO 5 ml、FBS 10 ml 及び0.122 g ニコチンアミドを添加しない無菌3% PVA 水溶液を作製し、これを用いて製造したシート状腓島細胞製剤を比較例1とした。

〔試験例 1〕 製剤中の細胞の安定性確認

上記製造例 1、比較例 1 又は遊離の膵島細胞（200 個）を、CMRL-1066 培地中で培養した（5% CO₂、37℃）。培養 1 日後の製造例 1 又は比較例 1 内の生細胞数及び遊離の膵島細胞数をそれぞれ顕微鏡下にてカウントし、生細胞の回収率（%）を求めた。回収率は培養前の細胞数を 100 として表した。

第 2 図に結果を示す。製造例 1 の生細胞の回収率は約 82% と、比較例 1 の回収率（約 35%）に比べて非常に高く、その値は遊離細胞の場合よりも高値であった。

〔試験例 2〕 製剤中のインスリン含有量の確認

上記製造例 1、比較例 1 又は遊離の膵島細胞（200 個）を CMRL-1066 培地中で培養し（5% CO₂、37℃）、培養 1 日後のそれぞれのインスリン含有量を調べた。培養 1 日後の製造例 1、比較例 1 又は遊離の膵島細胞を塩酸-EtOH に回収し、スパーテル等を用いてそれぞれすり潰し、次いでボルトックスで製剤中のゲル及び細胞を塩酸-EtOH 中に攪拌・懸濁した（-20℃、24 時間）。それぞれの細胞懸濁液中のインスリン濃度を測定した。インスリンは、市販インスリン測定 ELISA キット（レピスインスリンキット（シバヤギ））を用いて測定した。

結果を第 3 図に示す。製造例 1 中のインスリン含有量（約 205 ng/ml）は、比較例 1（約 20 ng/ml）に比べて著しく高値を示し、その値は遊離細胞とほぼ同程度であった。

〔試験例 3〕 製剤のインスリン分泌能及び細胞の状態確認

上記製造例 1、比較例 1 又は遊離の膵島細胞（200 個）を CMRL-10

6 6 培地中で培養し (5 % CO_2 、37℃)、培養1日後、7日後、14日後に、それぞれを回収した。回収後、それぞれについてグルコース反応試験を行った。グルコース反応試験は以下の通りである。まず、上記の回収した製造例1、比較例1又は遊離の膵島細胞を3.3mMのグルコース及び0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むCMRL-1066培地中で1時間培養(5% CO_2 、37℃)後、グルコースを含まないCMRL-1066培地で洗浄した。再度この操作を繰り返し、更に3.3mMのグルコースを含むCMRL-1066培地中で1時間培養した後、それぞれの上清中のインスリン濃度を測定した。次いで16.7mMのグルコースを含むCMRL-1066培地で1時間培養し、それぞれ上清中のインスリン濃度を測定した。

結果を第4図に示す。第4図中(a)は培養1日後、(b)は培養7日後、(c)は培養14日後のインスリン分泌量(濃度)をそれぞれ示す。比較例1では、グルコース濃度の上昇に依存したインスリン分泌量の上昇は見られなかった。これに対し、製造例1は培養1日後、7日後、14日後ともに、グルコース濃度の上昇に依存してインスリン分泌量(濃度)が上昇した。しかも遊離細胞では、既に7日後にグルコース濃度に依存したインスリン分泌量の上昇が見られなくなったのに対し、製造例1では14日後においてもその上昇が認められた。

また、製造例1又は比較例1中に含有される細胞を顕微鏡観察した結果、比較例1中の細胞は1日目から既に細胞破壊が生じていた。これに対し製造例1中の細胞は顕著な細胞破壊が認められず、14日後も比較的安定に生存していた(第5図)。第5図中、(a)は培養1日後、(b)は培養7日後、(c)は培養14日後の細胞観察像をそれぞれ示す。

以上の結果より、製造例1中において膵島細胞は安定に生存し、長期間安定にその活性を維持し、グルコース濃度の上昇に反応してインスリンを分泌することが分かった。従って、PVAに予めEC溶液を配合することにより、PVAゲル化の際の急冷による細胞の死滅及び細胞へのダメージが抑制され、その

結果、PVA中に含有される膵島細胞の生存率が高く、かつインスリン産生能及びグルコース濃度の上昇に対する反応性を維持できる細胞製剤が製造できることが証明された。

5 実施例 2

〔製造例 2〕膵島細胞を含有するシート状細胞製剤の製造

(1) 膵島細胞の調製

Wister ラットをジエチルエーテルの吸収およびネンブタール 1 mg / kg の腹腔内投与にて全身麻酔した。開腹したのち、総胆管を同定し、これを
10 ペイター (Vater) 乳頭部付近で無鉤鉗子によりクランプした。胆嚢管合流部に小切開を置き、カニュレーションチューブを総胆管に挿入、結紮固定し、
1200 ~ 1500 u / ml 相当の XI 型コラゲナーゼ (Sigma, St. Louis, MO, USA) を注入し、膵臓を膨化させた。膵を損傷しないように全摘し、フラスコに入れ、37℃の恒温槽の中につけ、18分前後で温消化した。消化後、数回
15 フラスコを震盪して膵を破碎し、0.1%ウシ血清アルブミンを加えたハンクス液で3回洗浄した。ハンクス液中に細胞を浮遊させたのち、850 μm 径のメッシュフィルターに通し、ろ過した内容物を回収した。

膵島分離は、デキストラン (Dextran 70) の比重勾配により行った。すなわち、上清を破棄した膵細胞成分を比重 1.094 のデキストラン +
20 ハンクス液に均一になるまで攪拌したのち、比重 1.094 のデキストラン液を静かに流入した。細胞層の上に比重 1.081 および 1.041 のデキストラン液を順次静かに入れ、4層にした。400 rpm で4分、さらに1700 rpm で13分遠心した。1層目と2層目の間に分離された膵島をハンドピックにて回収し、洗浄したのち、ハンドピックにて純化した。4回洗浄後、37℃、
25 5% CO₂ 95% 空気的环境下のインキュベーター中に一晚培養した。培地は、CMRL 1066 + 10% 不活化ウシ胎仔血清 + antibiotic-antimycotic

solution (Gibco, BRL) + ニコチンアミドを用いた。

(2) シート状膵島細胞製剤の調製

上記で得られた膵島細胞の培養液を用い、実施例 1 における製造例 1 の (2)、
(3)、(4) および (5) と同様にして細胞が活性化されたシート状膵島細胞
5 製剤 (製造例 2) を得た。

〔試験例 4〕 製剤のインスリン分泌能

上記得た膵島細胞製剤 (製造例 2、作製後 1 日目のもの) 又は遊離の膵島細胞に、試験例 3 と同様に、低濃度グルコース (3.3 mM) と高濃度グルコース (16.7 mM) による刺激を 1 時間ずつ加え、分泌するインスリン量を ELISA で測定した。

結果を第 6 図に示す。この第 6 図から分かるように、本発明にかかる膵島細胞製剤はグルコース刺激に応じてインスリンを分泌し、同時期の遊離の膵島細胞と比べて遜色がなかった。

15

〔試験例 5〕 移植試験

(1) 糖尿病モデルマウスの作製

8 ~ 10 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに、クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解したストレプトゾトシン 200 mg/kg を腹腔内投与した。投与後 1
20 週間で血糖を 3 回測定し、2 回以上血糖 350 mg/dl 以上になったマウスを糖尿病成立したものと判断し、実験に使用した。なお、ストレプトゾトシン投与を行わないマウスを、正常マウス群とした。

(2) 移植

膵島細胞製剤の移植は、次のようにして行った。すなわち、糖尿病モデルマウス (糖尿病作成後 1 週以上のもの) をエーテル麻酔下で正中切開にて開腹し、
25 上記製造例 2 で得た膵島細胞製剤 (製造例 2) を腹腔内に留置した後、腹壁を

2層に閉鎖した。このマウスを移植マウス群とした。なお、膵島細胞の入っていない製剤（比較例1と同様に調製）を移植したマウスを、糖尿病マウス群とした。

(3) 生存期間の検討

- 5 移植した時を0日とし、以後の生存期間を観察した。

結果を第7図に示す。この第7図から明らかなように、糖尿病マウス群では、過半数が移植後4週以内に死亡し、経過観察期間の8週まで生存したマウスは存在しなかった。一方、膵島細胞製剤を移植した移植マウス群では、高血糖状態が続き死亡した2匹以外はすべて8週以上生存した（8週までの生存率は、
10 0%対81.8%、 $p < 0.001$ ）。

(4) 血糖・体重測定

血糖、体重共に、移植前、移植後1日目、3日目、5日目、7日目に測定し、それ以降は毎週1回測定した。各群の血糖変化を第8図に示す。移植群では、移植後の血糖は、多数が速やかに300mg/dl未満に低下（13/16）
15 し、正常化したものも過半数に見られたが次第に上昇した（300mg/dl未満に保たれた日数は3日～7週）。しかし、血糖上昇の程度は軽度で、糖尿病マウス群に比べ血糖は有意に改善し（ $p < 0.0001$ ）、また、移植後8週までの生命予後も明らかに改善した。8週まで観察した9匹のうち6匹に膵島細胞製剤の摘出術を施行したが、そのうちの5匹に血糖の再上昇がみとめられた。

- 20 各群の平均体重の変化を第9図に示す。移植マウス群では、移植後、体重は術後の節食不良が原因と考えられるが減少し、移植後3週までの反復測定分散分析では、糖尿病マウス群との有意差は認められなかった。しかし、移植後3週には増加に転じ、経過中体重が最も低下した1週目に比べ、3週以降は有意な上昇を認めた（ $p < 0.05$ ）。さらに、3週および4週では同時期の糖尿病
25 マウス群の平均体重を有意に上回った。

(5) 腎機能測定

BUN（血中尿素窒素）、クレアチニンは、移植前、移植後は毎週1回測定した。移植後8週で膵島細胞製剤を摘出し、その後1週まで測定を行った。

BUNの変化を第10図に示す。膵島細胞製剤移植前に測定した血糖正常マウスBUNの平均±SEは $25.53 \text{ mg/dl} \pm 1.804$ （20–38.9）であった。ストレプトゾトシンを投与し1週間目の糖尿病マウス群のうち、41.3%にBUNの上昇が見られた（24/58、糖尿病マウス群：13/35 対 移植マウス群：11/23、 $\text{BUN} > 35 \text{ mg/dl}$ ）。実験に使用した糖尿病マウス群14匹のうち、13匹が経過中BUN高値を示した。

一方、移植マウス群16匹の検討では、術前にBUNが上昇した9匹は全て移植後1週で正常化が見られた。平均値では移植後1週で低下したBUN値は正常値とほとんど変わらず経過し、糖尿病マウス群との有意差が認められた（ $p = 0.002$ ）。

さらに、移植後8週で膵島細胞製剤を摘出した6匹のうち、4匹に摘出後1週のBUN値を計測したが、いずれも摘出前に比べ上昇していた。

クレアチニンの変化を第11図に示す。クレアチニンの正常値は $0.351 \text{ mg/dl} \pm 0.032$ （0.16–0.5）であった。ストレプトゾトシン投与後1週で半数近くの糖尿病群マウスが 0.5 mg/dl の高値を示し、投与後4週で全てのマウスにクレアチニン値に異常を認めた。また、クレアチニン上昇後、いずれのマウスも数週で死亡し、ストレプトゾトシン投与後10週まで生存できたマウスは存在しなかった。移植マウス群ではクレアチニンの移植後の上昇が6匹に認められたが、いずれも軽度で経過観察期間中生存可能であった。クレアチニン平均値は移植マウス群では、移植後5週のみ 0.5 mg/dl を上回ったが、他のいずれの期間でも 0.4 mg/dl 台に落ち着いており、糖尿病マウス群に比べ有意に低下していた（ $p = 0.0478$ ）。また、膵島細胞製剤摘出後はBUN同様、全てのマウスに再上昇が認められた。

（6）尿検査

24時間尿を採取し、尿量、24時間尿糖排泄量、24時間尿アルブミン排泄量、尿ケトン体を測定した。移植マウス群、糖尿病マウス群、正常血糖マウス群ともに代謝ケージ内で24時間、自由飲水、食事環境下で飼育し、24時間尿を回収した。尿糖はFujidRI-CHEMシステムで測定し、尿量を乗じたものを尿糖排泄量とした。また、24時間尿アルブミン排泄量は、尿アルブミン濃度をELISA (Albuwell M (Exocell)) で測定し、24時間尿量を乗ずることで算出した。尿ケトン体はウロテープ (栄研) を使用し、色調を数値化することで評価した。

24時間尿量の変化を第12図に示す。移植マウス群は糖尿病マウス群と比べ有意差はないが、若干の低値を示した。

尿糖排泄量の変化を第13図に示す。糖尿排泄量に関しても、移植マウス群は糖尿病マウス群に比べて低値で、移植後3週まで有意差が認められた ($p < 0.0452$)。

また、尿ケトン体量の変化を第14図に示す。尿ケトン体量は糖尿病マウス群、移植マウス群共に移植前で上昇した。移植マウス群では、移植後1週で正常化し、その後も糖尿病マウス群と比べ有意に低下した ($p = 0.0294$)。

さらに、尿アルブミン量の変化を第15図に示す。尿アルブミン量は、移植マウス群で糖尿病マウス群よりも低値を示したが、有意差は認められなかった。

(7) 1, 5-アンヒドロ-D-グルシトール (1, 5-AG) 測定

糖尿病の程度を検討するため、1, 5-AG測定を行った。1, 5-AGはグルコースと極めて類似した構造を持つポリオールで、主として食物中より摂取、吸収され、体内に広く豊富に蓄積される。そして腎にて再吸収を受ける。グルコースと競合作用があり、糖尿病時には尿糖のAG再吸収は阻害を受け、尿中AG排泄の増大と、血中AGの減少につながる。したがって、1, 5-AGは、グルコースの動態に対し極めて鋭敏に反応するため、リアルタイムの糖尿病の状態を反映するマーカーとなりうる。移植マウス群、糖尿病マウス群、

正常血糖マウス群とともに移植前と、移植後毎週 1 回尾静脈より血液 $25\mu\text{l}$ を採取し、動物用 1, 5-A G キット（日本化薬）で測定した。

結果を第 16 図に示す。この図から明らかなように、正常血糖マウス群に比べ、糖尿病マウス群では 1, 5-A G 濃度は明らかに低値であり、糖尿病の状態をよく反映した。移植マウス群の 1, 5-A G 平均値は術前と比べ、1 週で上昇した。また、期間中糖尿病マウス群と比較して有意な上昇が認められた ($p = 0.0203$)。

(8) 考察

上記移植実験から明らかなように、本発明の膵島細胞製剤は、それを移植することにより、糖尿病状態を改善し、糖尿病による死亡および糖尿病性の腎障害の予防に有効であることが分かる。また、本発明の膵島細胞製剤の移植は、糖尿病の治癒のみでなく、合併症予防の点からも有効である。

産業上の利用可能性

本発明により、患者にとって有用なホルモン又はタンパク質等の生物学的活性因子を分泌する細胞を、パイオ人工臓器に用いられる高分子重合体として適切な材料である PVA 中で安定かつ長期に保持できる細胞製剤を提供することができる。更には、本発明を患者に投与するにより、内分泌・代謝疾患、血友病、骨疾患又は癌等の予防及び治療を行うことができる。本発明は、細胞を安定な状態で長期間有することができるため、その移植の頻度を低減することができ、しかも様々な形状に形成できるため、注射等による皮下や筋肉内への移植も可能である。

請 求 の 範 囲

1. 細胞保存剤が配合されたポリビニルアルコール中に、細胞を含有する細胞製剤。
5
2. 細胞表面が、更に細胞外マトリックスで覆われていることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の細胞製剤。
3. 更にグロースファクターを含有することを特徴とする請求の範囲第1項
10 又は第2項に記載の細胞製剤。
4. 細胞が、膵島細胞、膵内分泌細胞、肝細胞、前葉細胞、成長ホルモン分泌細胞、骨細胞、甲状腺ホルモン分泌細胞及び副甲状腺ホルモン分泌細胞から成る群から選択される1種又は2種以上の細胞であることを特徴とする請求の
15 範囲第1項～第3項のいずれかに記載の細胞製剤。
5. 細胞が、細胞保存剤で処理されていることを特徴とする請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の細胞製剤。
- 20 6. 細胞が、形質転換体であることを特徴とする請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の細胞製剤。
7. シート状、板状、棒状、チューブ状又はビーズ状の形状を有することを特徴とする請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の細胞製剤。
25
8. 細胞保存液が、Euro-Collins液、セルバンカー又はUW液

であることを特徴とする請求の範囲第1項～第7項のいずれかに記載の細胞製剤。

9. 哺乳動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に移植することを特徴とする請求の
5 範囲第1項～第8項に記載の細胞製剤。

10. 請求の範囲第1項～第9項のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする内分泌・代謝疾患の予防及び治療方法。

- 10 11. 内分泌・代謝疾患が、糖尿病又は下垂体性小人症であることを特徴とする請求の範囲第10項に記載の内分泌・代謝疾患の予防及び治療方法。

12. 請求の範囲第1項～第9項のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする血友病の予防及び治療方法。

15

13. 請求の範囲第1項～第9項のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする骨疾患の予防及び治療方法。

14. 請求の範囲第1項～第9項のいずれかに記載の細胞製剤を用いること
20 を特徴とする癌の予防及び治療方法。

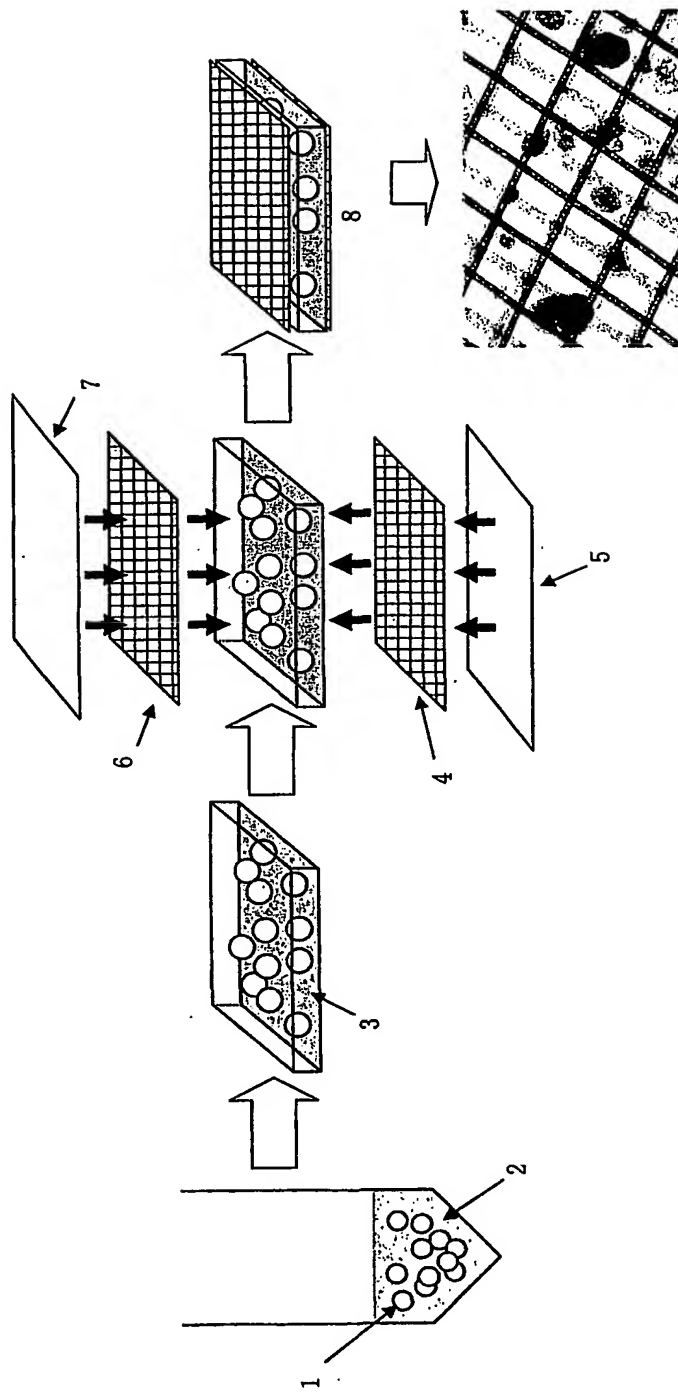
15. 請求の範囲第1項～第9項のいずれかに記載の細胞製剤を用いることを特徴とする肝不全又は先天性代謝異常の予防及び治療方法。

- 25 16. ポリビニルアルコールに細胞保存剤を配合後、細胞を該ポリビニルアルコールに混合し、得られた細胞含有ポリビニルアルコールをゲル化すること

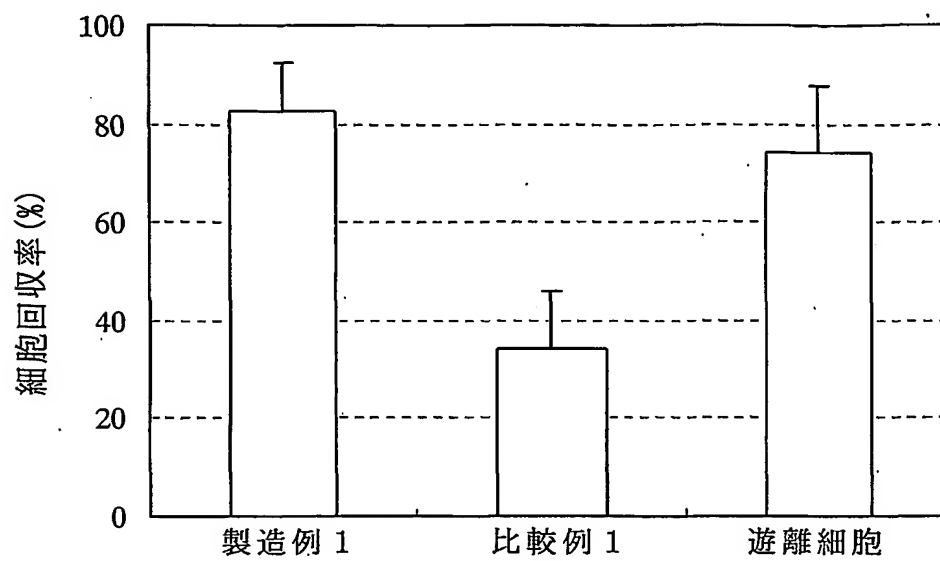
を特徴とする細胞製剤の製造方法。

17. ヒト又は動物用の医薬である請求の範囲第1項～第9項のいずれかに記載の細胞製剤。

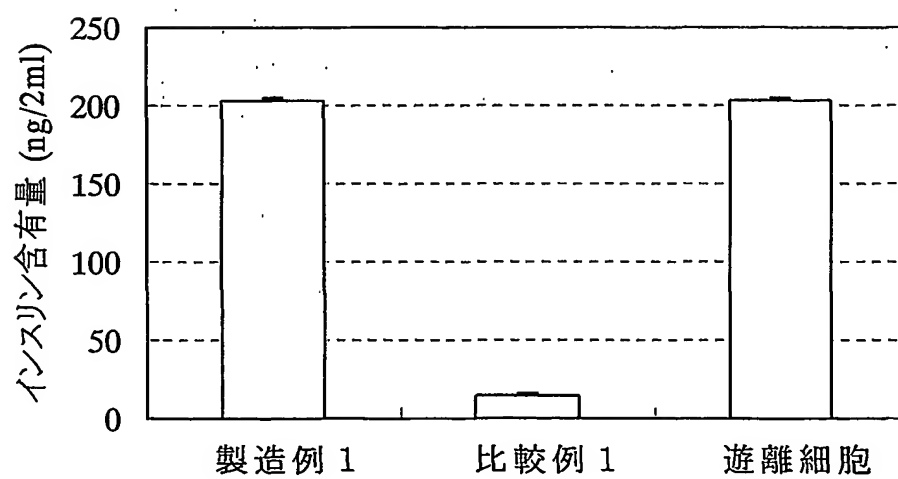
第1図



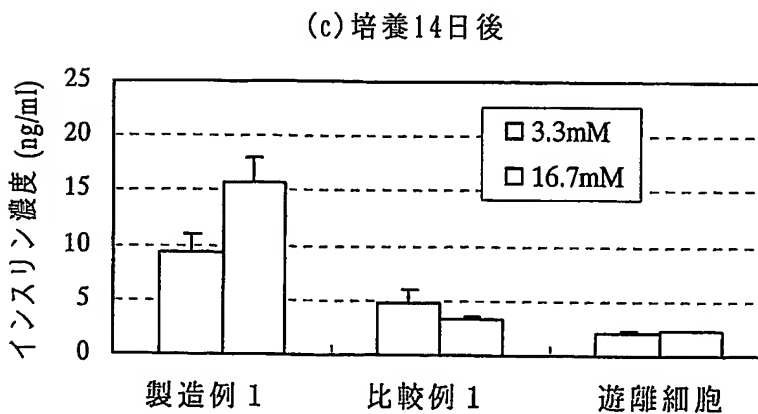
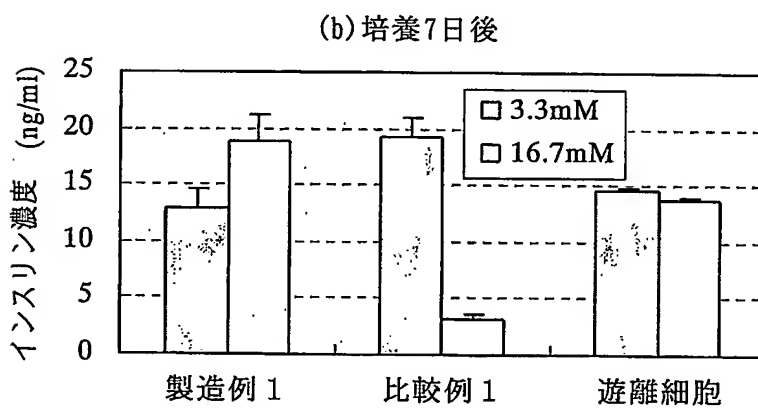
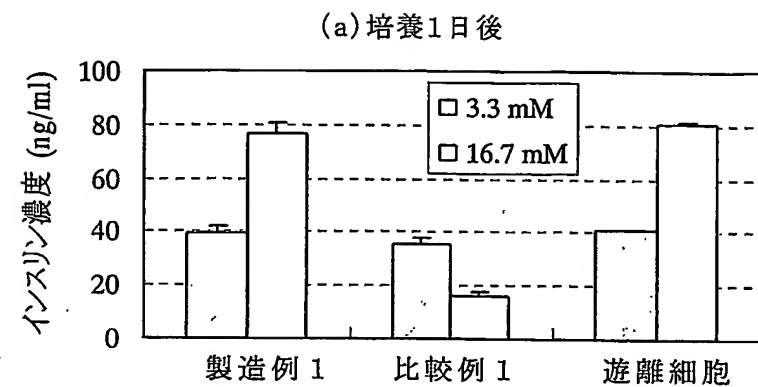
第2図



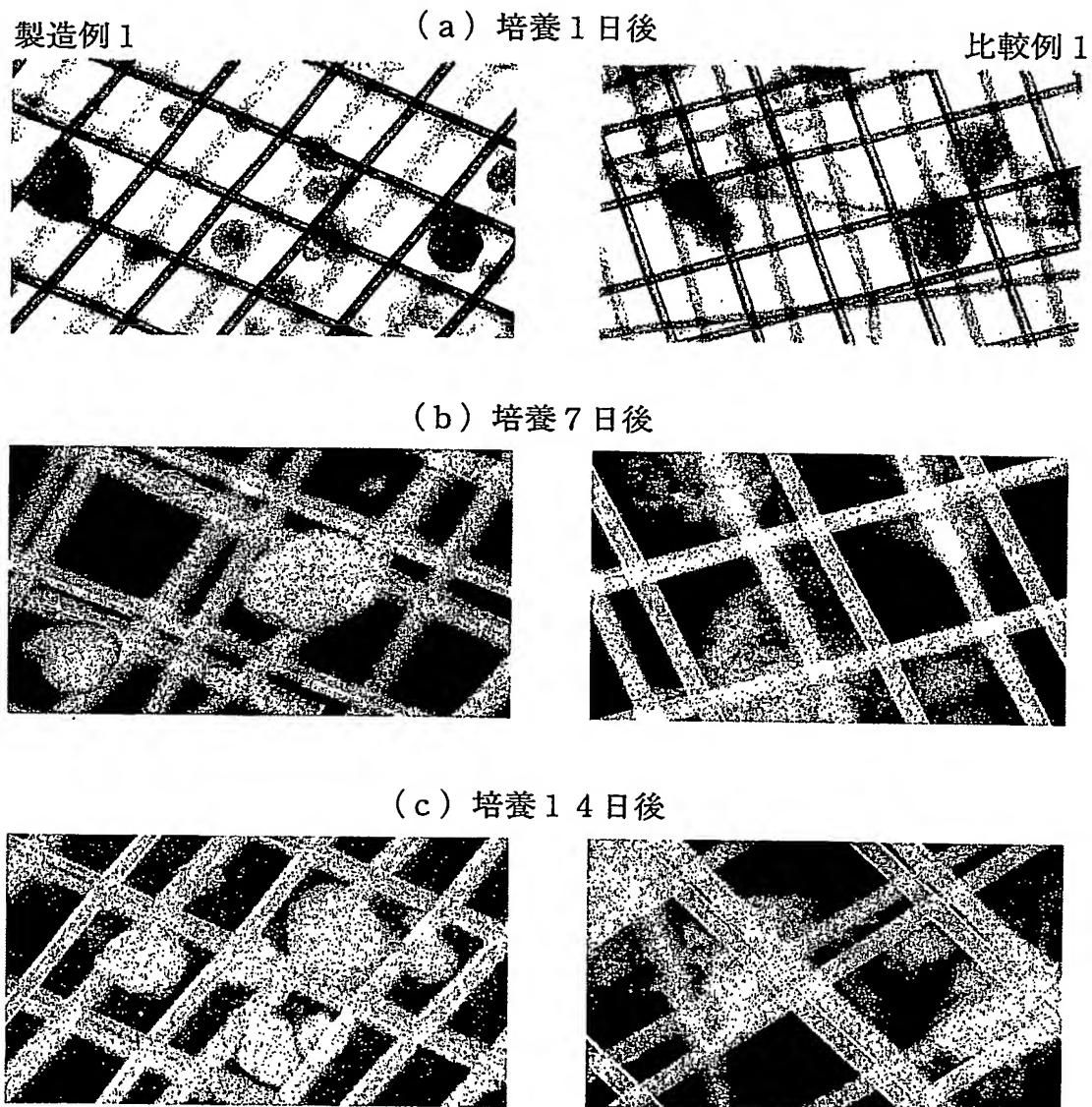
第3図



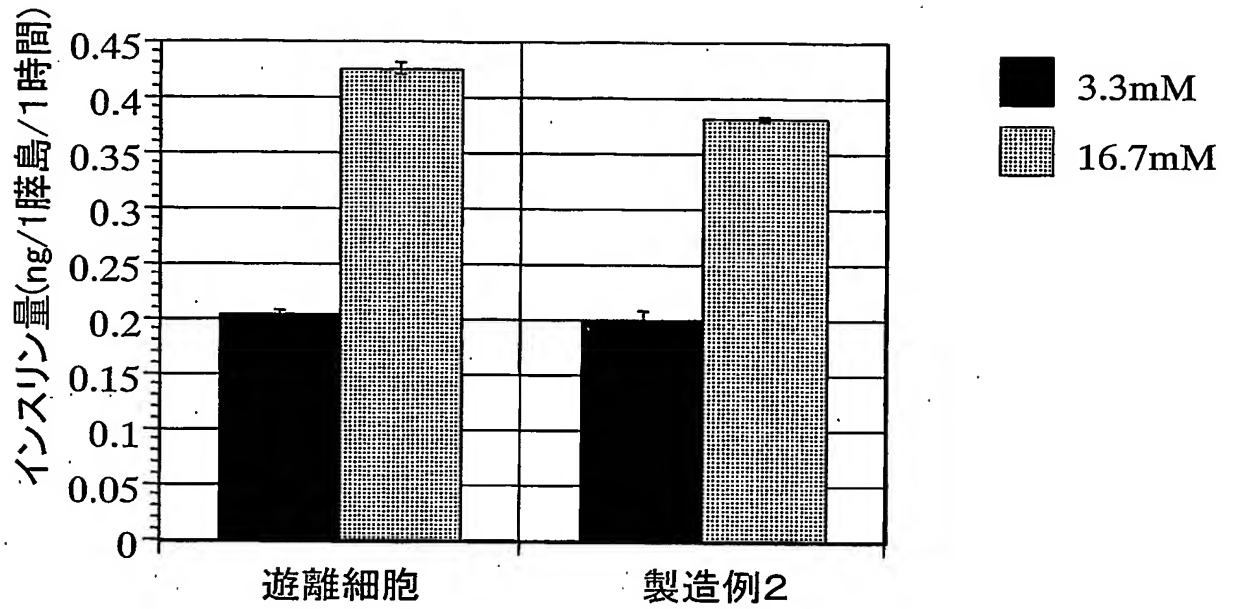
第4図



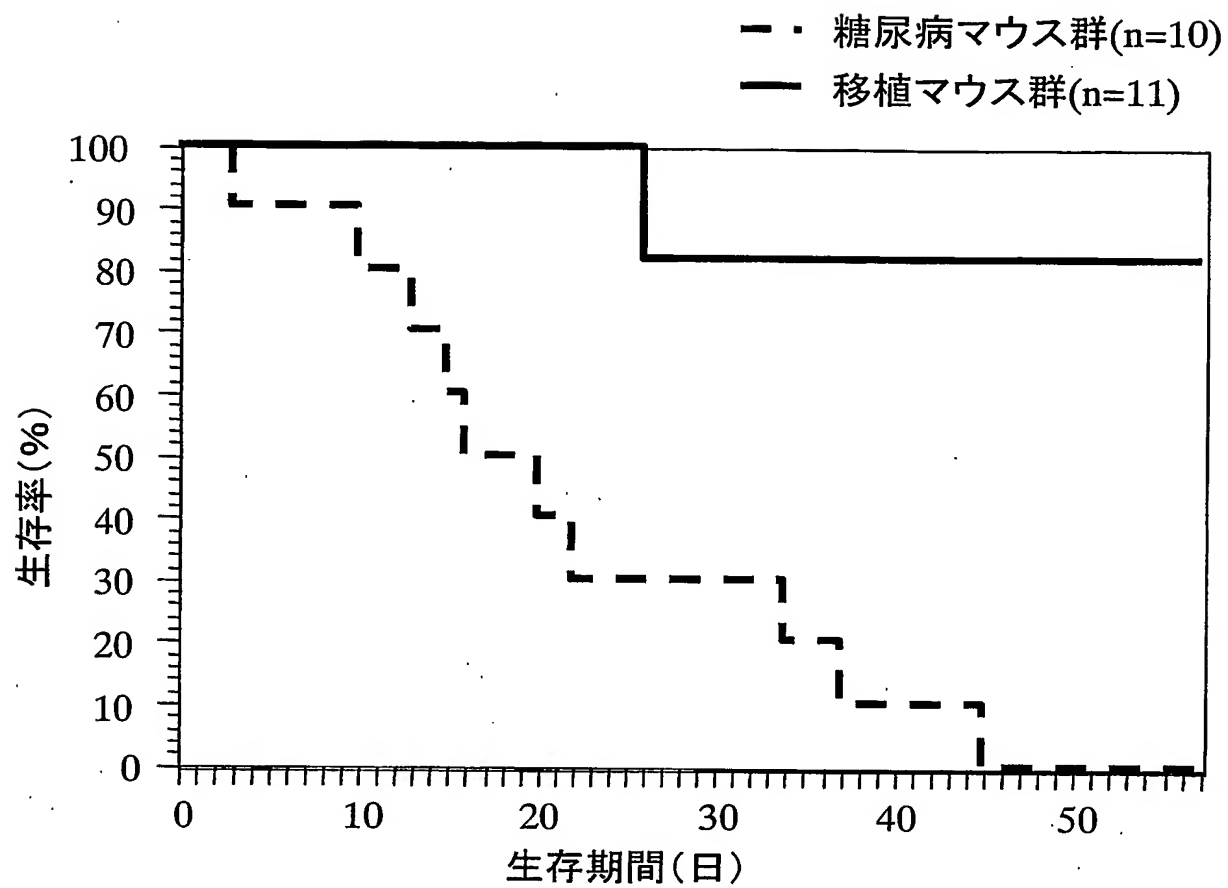
第5図



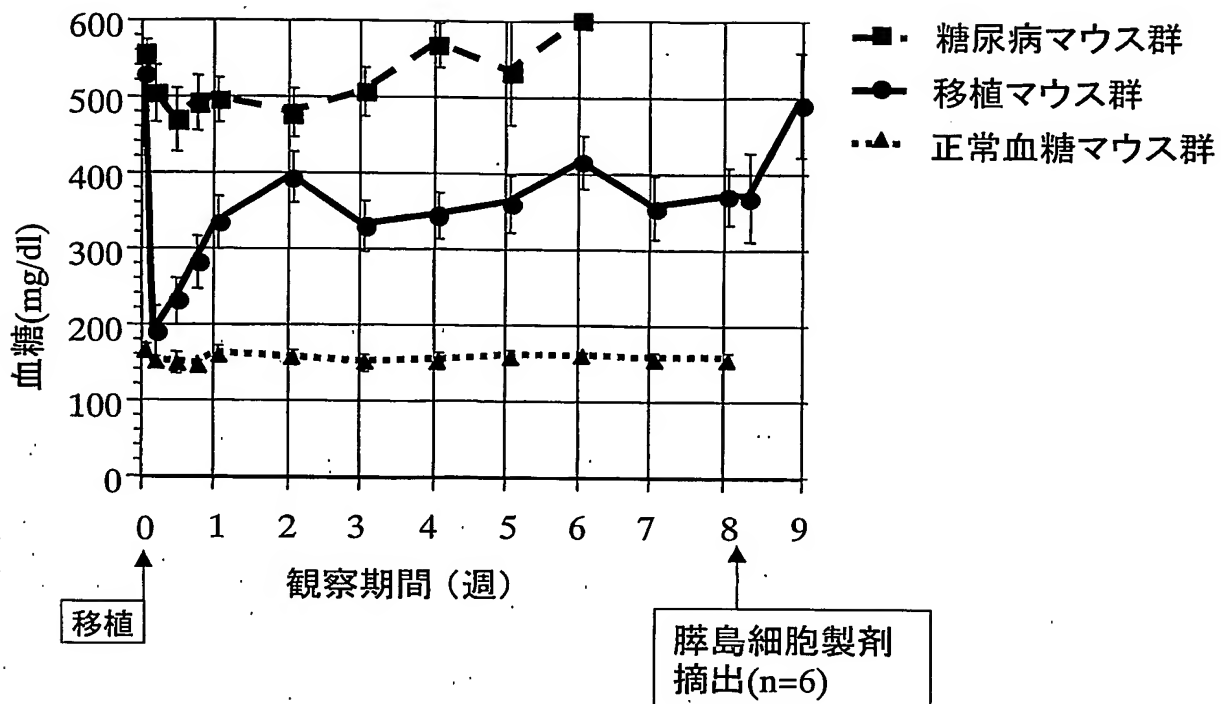
第6図



第7図



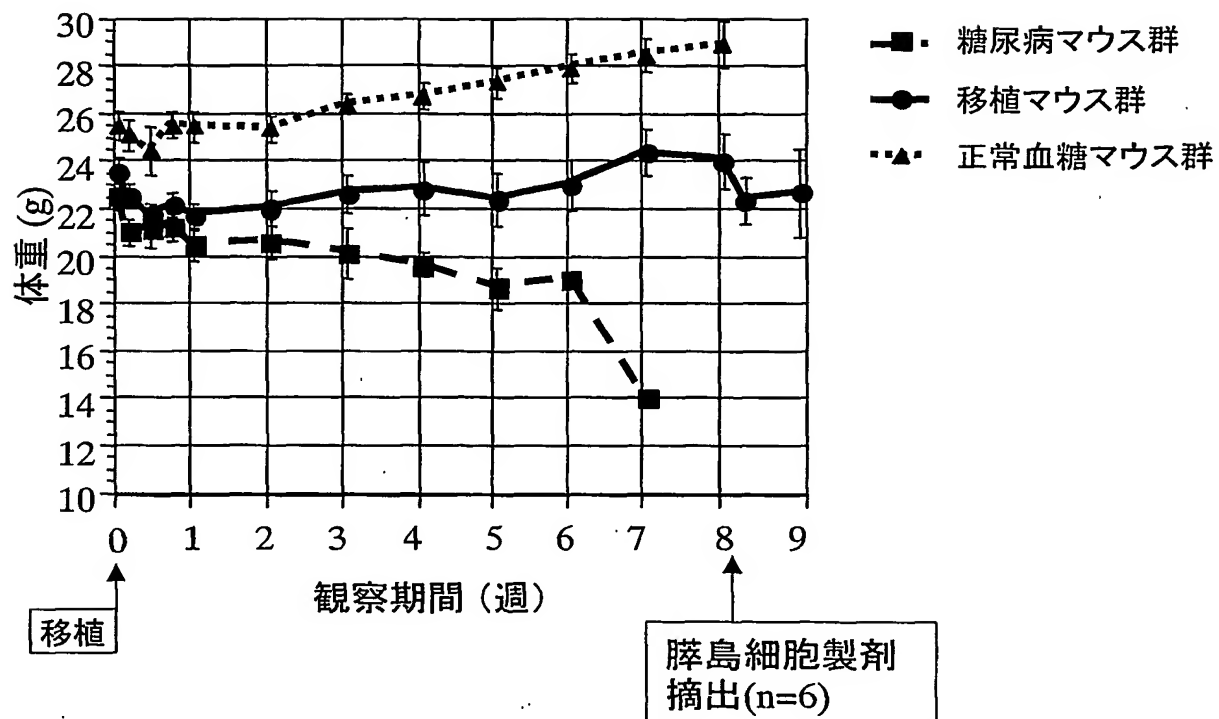
第8図



マウス匹数の
変化(n)

	前	1日	3日	5日	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
糖尿病マウス群	14	12	12	12	13	11	8	5	3	1	0	0
移植マウス群	16	16	16	16	16	14	13	11	11	10	9	9
正常血糖マウス群	11	11	7	8	11	11	11	11	10	10	9	9

第9図

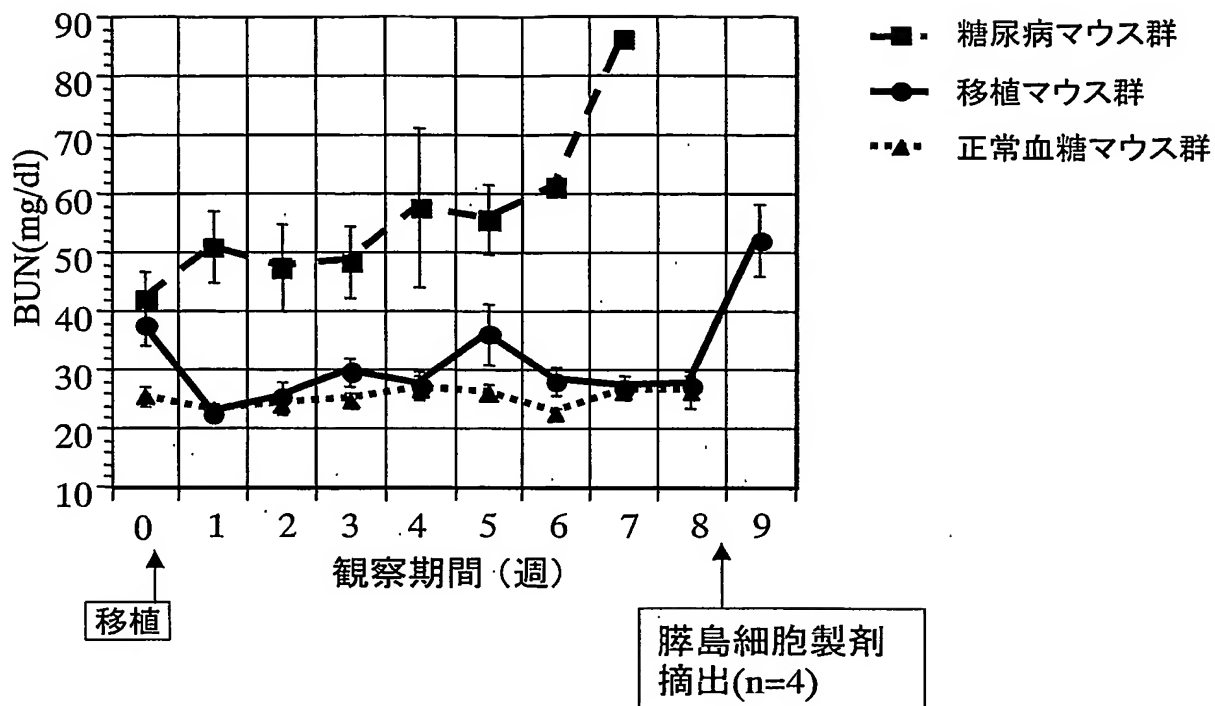


マウス匹数の
変化(n)

前 1日 3日 5日 1週 2週 3週 4週 5週 6週 7週 8週

糖尿病マウス群	14	12	12	12	13	12	8	5	3	1	1	0
移植マウス群	16	16	16	16	16	14	13	11	11	10	9	9
正常血糖マウス群	11	11	7	8	11	11	11	11	10	10	9	9

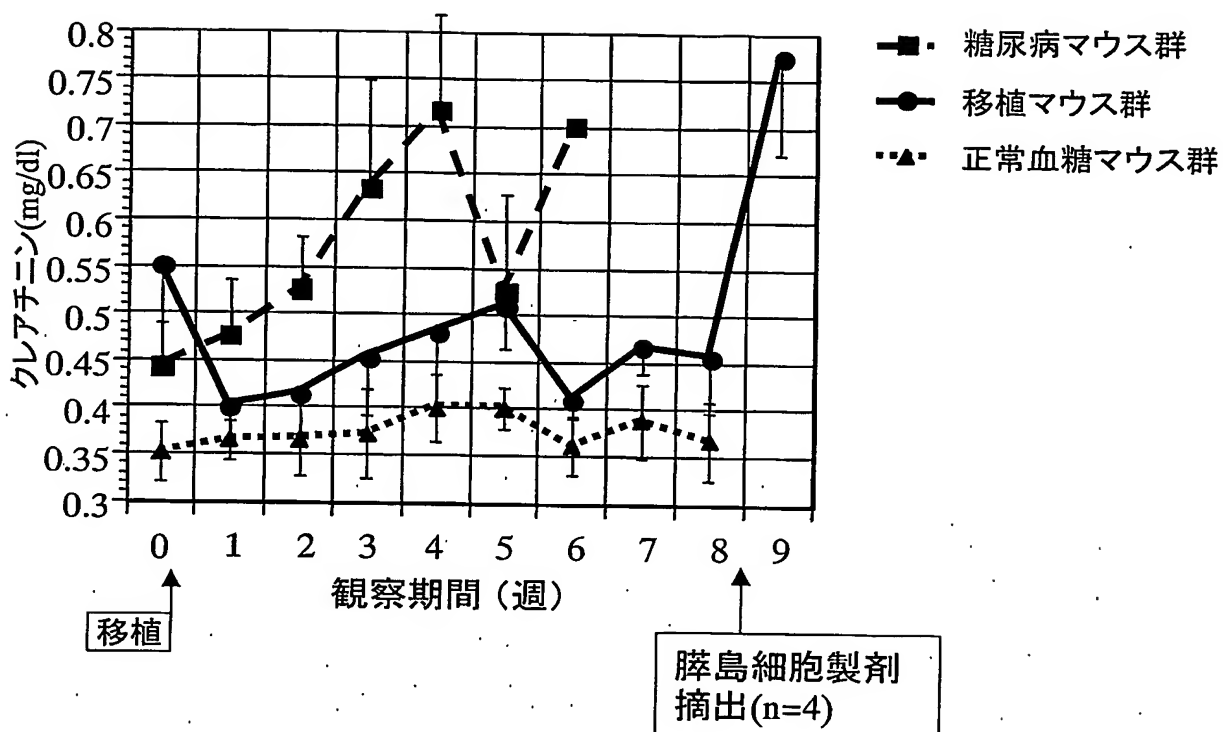
第10図

マウス匹数の
変化(n)

	前	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
糖尿病マウス群	14	13	12	8	6	3	1	1	0
移植マウス群	16	16	14	13	11	11	10	9	9
正常血糖マウス群	10	8	9	11	11	10	10	9	9

10/15

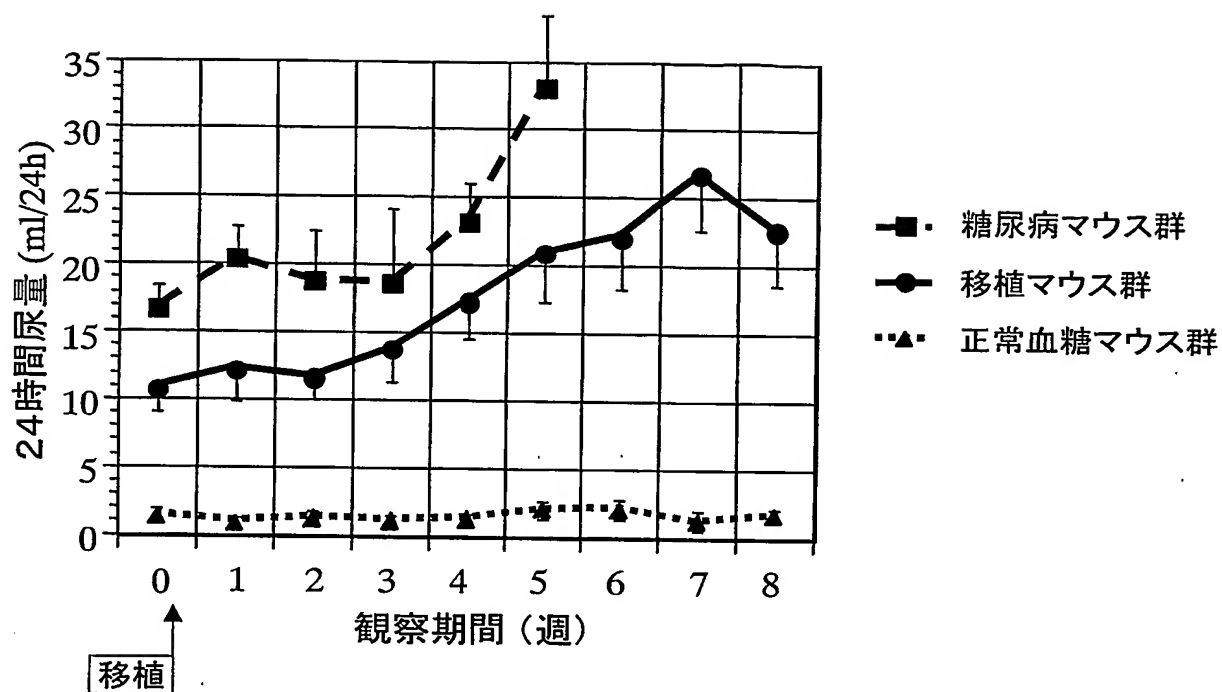
第11図



マウス匹数の
変化(n)

	前	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
糖尿病マウス群	14	13	12	6	6	4	1	1	0
移植マウス群	16	16	14	13	11	11	10	9	9
正常血糖マウス群	10	8	9	11	11	10	10	8	9

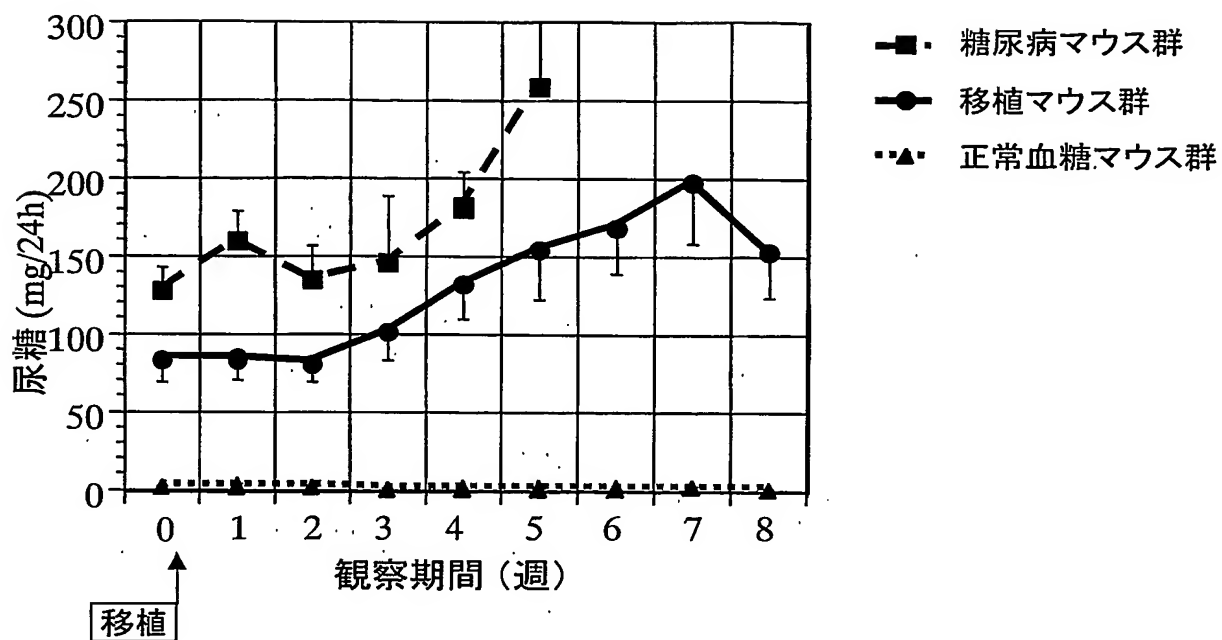
第12図



マウス匹数の変化(n)

	前	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
糖尿病マウス群	13	11	7	5	5	2	0	0	0
移植マウス群	13	13	12	10	9	8	8	7	7
正常血糖マウス群	11	11	11	11	11	10	10	9	9

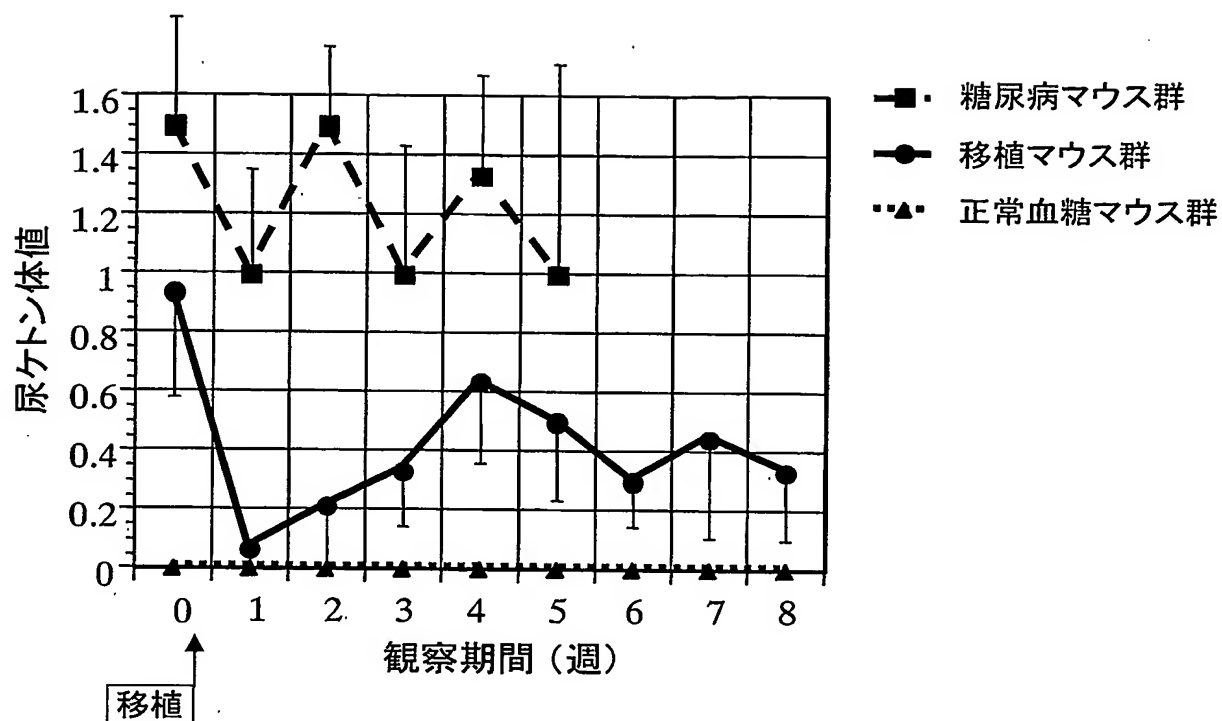
第13図



マウス匹数の
変化(n)

	前	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
糖尿病マウス群	13	11	7	5	5	2	0	0	0
移植マウス群	13	13	12	10	9	8	8	7	7
正常血糖マウス群	10	8	10	9	10	10	10	7	9

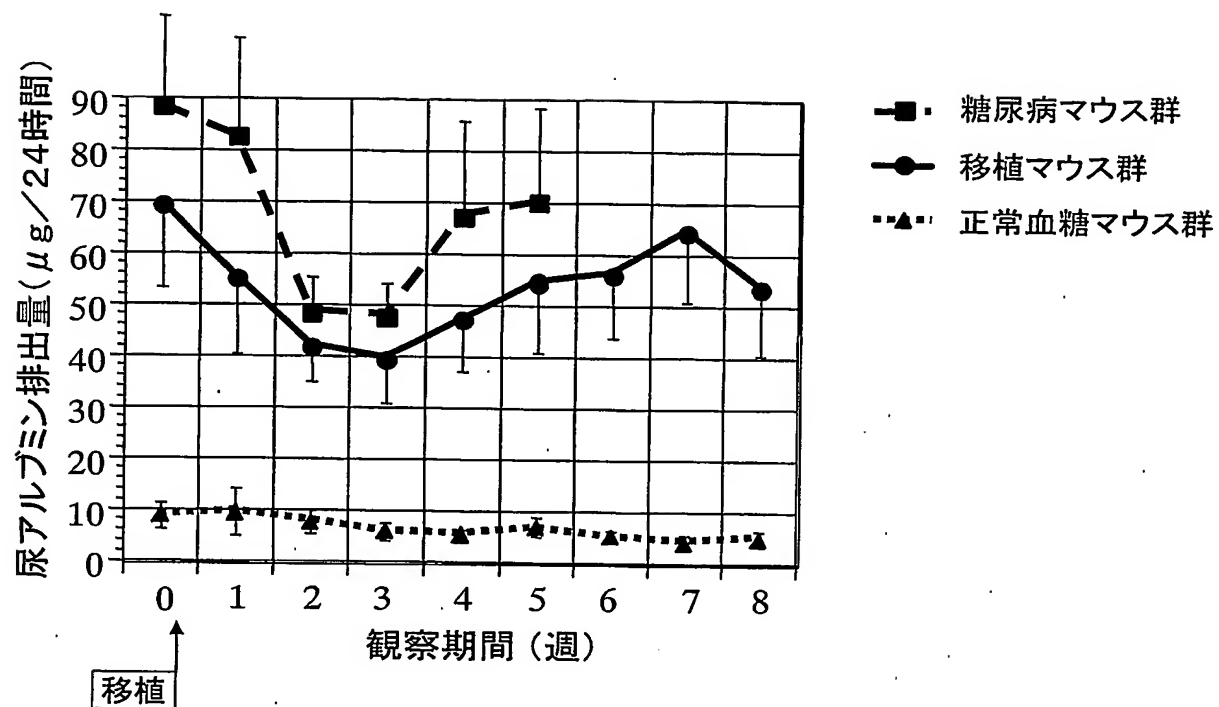
第 1 4 図



マウス匹数の
変化(n)

	前	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
糖尿病マウス群	14	12	8	7	6	4	0	0	0
移植マウス群	16	15	14	12	11	10	10	9	9
正常血糖マウス群	10	8	10	9	10	9	10	7	9

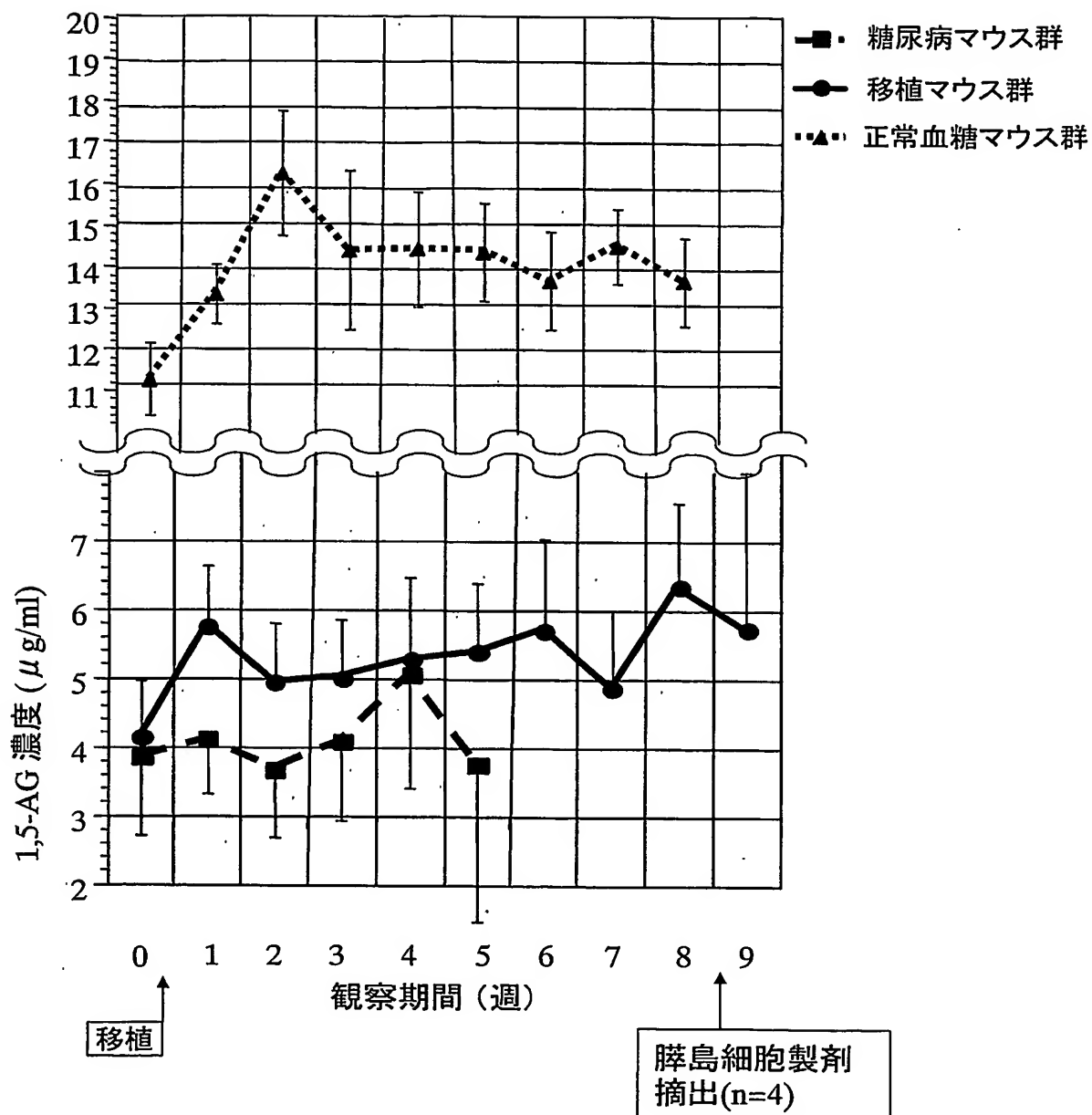
第15図



マウス匹数の
変化(n)

	前	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
糖尿病マウス群	13	10	7	5	5	2	0	0	0
移植マウス群	13	13	12	10	9	8	8	7	7
正常血糖マウス群	10	8	10	10	10	9	10	8	9

第16図



マウス匹数の
変化(n)

	前	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
糖尿病マウス群	11	10	9	4	3	2	0	0	0
移植マウス群	14	13	12	11	9	10	9	7	6
正常血糖マウス群	11	11	11	11	10	10	10	9	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14271

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61L27/38, A61K35/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61L27/38, A61K35/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. Mitsuo et al., Efficacy of Mesh Reinforced Polyvinylalcohol Tube as a Novel Device for Bioartificial Pancreas: A Functional Study of Rat Islets In Vivo, Transplantation Proceedings, Vol.24, No.6, 1992, pages 2939 to 2940	1-9,17
Y	Inui H. et al., Cold preservation of rat pancreatic islets just above the freezing point using university of Wisconsin solution, Pancreas., Vol.23, No.4, 2001, pages 382 to 386., (abstract) Medline[online] Medline Accession No.2001565353	1-9,16-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 January, 2004 (19.01.04)

Date of mailing of the international search report
03 February, 2004 (03.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14271

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kanazawa S. et al., Forskolin-stimulated adenylylcyclase activity: a marker to assess islet cell viability following cold storage in different solutions and to predict islet cell function following transplantation, Cell transplant., Vol.8, No.4, 1999, pages 383 to 388, (abstract)Medline[online] Medline Accession No. 1999405823	1-9,16-17
Y	WO 96/27662 A (Metabolex Inc.), 12 September, 1996 (12.09.96), Full text & CA 2214088 A & AU 705108 B2 & EP 815212 A & JP 11-501512 A & US 5738876 A	1-9,16-17
A	JP 2001-270831 A (Lion Corp.), 02 October, 2001 (02.10.01), Full text (Family: none)	16
A	JP 01-246201 A (Wisconsin Alumni Research Foundation), 02 October, 1989 (02.10.89), Full text & US 4879283 A & GB 2213362 B & FR 2625073 B & AU 609236 B	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14271

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10 to 15

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10 to 15 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L 27/38, A61K 35/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L 27/38, A61K 35/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	M. Mitsuo et al., Efficacy of Mesh Reinforced Polyvinylalcohol Tube as a Novel Device for Bioartificial Pancreas: A Functional Study of Rat Islets In Vivo, Transplantation Proceedings, Vol.24, No.6, 1992, p.2939-2940	1-9, 17
Y	Inui H et al., Cold preservation of rat pancreatic islets just above the freezing point using university of Wisconsin solution, Pancreas., Vol.23, No.4, 2001, pages 382-386. (abstract) Medline[online] Medline Accession no.2001565353	1-9.16-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.01.04

国際調査報告の発送日

03.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子



4C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	kanazawa S et al., Forskolin-stimulated adenylylcyclase activity: a marker to assess islet cell viability following cold storage in different solutions and to predict islet cell function following transplantation, Cell Transplant., Vol.8, No.4, 1999, pages 383-388. (abstract) Medline[online] Medline Accession no.1999405823	1-9.16-17
Y	WO 96/27662 A (メタボレックス, インコーポレイテッド) 1996.09.12, 全文 &CA 2214088 A &AU 705108 B2 &EP 815212 A &JP 11-501512 A &US 5738876 A	1-9.16-17
A	JP 2001-270831 A (ライオン株式会社) 2001.10.02, 全文 (ファミリーなし)	16
A	JP 01-246201 A (ウイスコンシン アラムナイ リサーチ フォンデーション) 1989.10.02, 全文 &US 4879283 A &GB 2213362 B &FR 2625073 B &AU 609236 B	8

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10-15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 10-15 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。